

ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME

- Bestimmung im Seminalplasma -

REIMUND ENGL

1986

*Liss
München*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME

- Bestimmung im Seminalplasma -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reimund Engl
aus
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.-B. Schill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1986

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACE	=	Angiotensin-Converting-Enzyme
DMF	=	N,N-Dimethylformamid
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
EDTA	=	Ethylen-Diamino-Tetra-Essigsäure
HHL	=	Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin
KKS	=	Kallikrein-Kinin-System
MG	=	Molekulargewicht
RAS	=	Renin-Angiotensin-System



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS) und des Renin-Angiotensin-Systems.....	1
1.1.1.	Historische Entwicklung.....	1
1.1.2.	Erforschte Mechanismen.....	5
1.1.3.	Regulatorische Bedeutung.....	8
1.2.	Das Kallikrein-Kinin-System und die menschliche Fortpflanzung.....	11
1.2.1.	Die Bedeutung bei der Frau.....	11
1.2.2.	Das Kallikrein-Kinin-System und die Fertilitätsstörungen beim Mann.....	11
1.3.	Die Nachweismethoden für das Angiotensin-Converting-Enzyme.....	13
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1.	Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Aktivität im Seminalplasma.....	16
2.1.1.	Radiologische Bestimmung von ACE.....	16
2.1.2.	Bestimmung der Angiotensin-Converting-Enzyme-Aktivität mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin....	18
2.1.2.1.	Herstellung des Substrats.....	18
2.1.2.2.	Seminalplasmaaufbereitung.....	18
2.1.2.3.	Durchführung des Tests.....	18
2.1.3.	Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Angiotensin-Converting-Enzyme-Bestimmung im humanen Seminalplasma mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin.....	21
2.1.3.1.	Linearität.....	21
2.1.3.2.	Reproduzierbarkeit.....	21
2.1.3.3.	Interassay-Genauigkeit.....	22
2.1.4.	Eigenschaften des Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma.....	22
2.1.4.1.	Temperaturabhängigkeit.....	22

2.1.4.2.	Bestimmung der optimalen Substratkonzentration.....	23
2.1.4.3.	Hemmung der ACE-Aktivität mit Gossypol acetic acid.....	24
2.1.4.3.1.	DMSO als Lösungsvermittler.....	25
2.1.4.3.2.	N,N-Dimethylformamid als Lösungsvermittler..	25
2.1.4.4.	Hemmung der ACE-Aktivität mit Captopril.....	26
2.1.4.5.	Hemmung der ACE-Aktivität mit EDTA.....	28
2.1.5.	Verteilung von Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma.....	29
2.1.5.1.	Untersuchungen von Membranvesikelfraktionen	29
2.1.5.1.1.	Definition der "Prostasomen".....	29
2.1.5.1.2.	Isolierung der Membranvesikelfraktion.....	29
2.1.5.1.3.	Bestimmung der ACE-Aktivität in der Membranvesikelfraktion.....	31
2.1.5.1.4.	Hemmung der ACE-Aktivität in der Membranvesikelfraktion mit EDTA.....	31
2.1.5.2.	Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie.....	32
2.1.5.3.	Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit Klinefelter Syndrom....	32
2.1.5.4.	Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen.....	34
2.1.5.5.	Bestimmung der ACE-Aktivität in Split-Ejakulaten.....	35
2.1.5.6.	Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten vor und nach Vasektomie....	36
2.2.	Bestimmung der ACE-Aktivität im Blutserum...	37
3.	ERGEBNISSE.....	39
3.1.	Radiologische Bestimmung von ACE.....	39
3.2.	Bestimmung der Angiotensin-Converting-Enzyme Aktivität mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin..	40
3.2.1.	Auswertung.....	40

3.2.2.	UV-Absorptionsspektrum von Hippursäure und Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin.....	41
3.3.	Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Angiotensin-Converting-Enzyme-Bestimmung im humanen Seminalplasma mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin.....	42
3.3.1.	Linearität.....	42
3.3.2.	Reproduzierbarkeit.....	44
3.3.3.	Interassay-Genauigkeit.....	46
3.4.	Eigenschaften des Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma.....	48
3.4.1.	Temperaturabhängigkeit.....	48
3.4.2.	Bestimmung der optimalen Substratkonzentration.....	49
3.4.3.	Hemmung der ACE-Aktivität mit Gossypol acetic acid.....	52
3.4.3.1.	DMSO als Lösungsvermittler.....	52
3.4.3.2.	N,N-Dimethylformamid (DMF) als Lösungsvermittler.....	54
3.4.4.	Hemmung der ACE-Aktivität mit Captopril.....	59
3.4.5.	Hemmung der ACE-Aktivität mit EDTA.....	62
3.5.	Verteilung von Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma.....	63
3.5.1.	Untersuchungen von Membranvesikelfraktionen..	63
3.5.1.1.	Isolierung der Membranvesikelfraktionen.....	63
3.5.1.2.	Bestimmung der ACE-Aktivität in den Membranvesikelfraktionen.....	63
3.5.2.	Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit Normozoospermie.....	67
3.5.3.	Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit Klinefelter Syndrom....	69
3.5.4.	Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen.....	71

3.5.5.	Bestimmung der ACE-Aktivität in Split-Ejakulaten	75
3.5.6.	Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten vor und nach Vasektomie.....	78
3.6.	Bestimmung der ACE-Aktivität im Blutserum.....	79
4.	DISKUSSION.....	87
4.1.	Kininase II und ACE.....	87
4.2.	Durchgeführte Nachweismethoden.....	89
4.3.	Eigenschaften des im humanen Seminalplasma vorhandenen Angiotensin-Converting-Enzyme.....	91
4.4.	Das Angiotensin-Converting-Enzyme bei verschie- denen andrologischen Krankheitsbildern.....	93
4.5.	Ausblicke.....	97
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
7.	DANKSAGUNG.....	116
8.	LEBENS LAUF.....	117

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS) und des Renin-Angiotensin-Systems

1.1.1. Historische Entwicklung

Im Jahre 1898 entdeckten Tigerstedt und Bergman (86), daß ein Extrakt aus Nierengewebe intravenös injiziert eine Erhöhung des Blutdrucks hervorruft. Sie nannten die aktive Komponente "Renin".

Munoz (46) fand im Jahre 1939 heraus, daß dieses Renin ein Enzym ist, das die Umwandlung eines biologisch unwirksamen Polypeptids, das Hypertensinogen (= Angiotensinogen) bezeichnet wurde, in biologisch aktives Hypertensin (= Angiotensin I) bewirkt.

Den ersten Hinweis auf ein Enzym, das Angiotensin I weiter transformiert, lieferte Skeggs (78) im Jahre 1954. Er entdeckte, daß durch dieses Ferment, das später Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) genannt wurde, Angiotensin II aus Angiotensin I in Anwesenheit von Halogen- und Nitrationen gebildet wird. Helmer (28) erkannte, daß Angiotensin II blutdrucksteigernde Wirkung besitzt. In weiteren Untersuchungen ermittelte Skeggs (79, 80) die Aminosäuresequenz von Angiotensin I und fand heraus, daß es sich um ein Decapeptid handelt, das durch C-terminale Abspaltung von L-Histidyl-L-Leucin in das vasokonstriktorisches hochaktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt wird. Diese Zusammenhänge sind in der Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems (Abb. 1) wiedergegeben.

In der folgenden Zeit wurde untersucht, in welchen Geweben Angiotensin-Converting-Enzyme vorkommt. Caldwell (9) be-

Tetradecapeptid Renin Substrat

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser-R

(Renin-Substrat, Angiotensinogen)

Renin

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu + Leu-Val-Tyr-Ser-R
(Angiotensin I)

Angiotensin-Converting-Enzyme

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe + His-Leu
(Angiotensin II)

Abb. 1 Das Renin-Angiotensin-System nach Skeggs

richtete, daß ACE eine Komponente der vaskulären Endotheloberflächen aller Organe darstellt. Es wurde erkannt, daß die Lunge bei der Entstehung des Angiotensin II, das durch seine blutdrucksteigernde Wirkung für das arterielle Drucksystem wichtig ist, eine spezielle Rolle spielt.

Im Jahre 1965 beobachtete Ferreira (18), daß eine Mischung aus den Peptiden des Schlangengiftes der Viper Bothrops jaraca die Aktivität des von Rocha e Silva (56) entdeckten Bradykinins erhöht, indem die Aktivität der Bradykininase gehemmt wird. Bakhle (5) fand heraus, daß dieses Gift sowohl den Abbau von Bradykinin als auch die Aktivität des ACE inhibiert. Durch weitere Forschungen wurde bewiesen, daß die Bradykininase und ACE identische Enzyme sind. ACE spielt somit eine Schlüsselrolle im Renin-Angiotensin-System und im Kallikrein-Kinin-System.

Die Hauptsubstanz des Kallikrein-Kinin-Systems, das Kallikrein, wurde in den Jahren 1925 bis 1928 von E. K. Frey und H. Kraut (21) entdeckt. Das Kallikrein, dessen blutdrucksenkende, gefäßerweiternde und durchblutungsfördernde Eigenschaften damals aufgefallen waren, wurde aus der Bauchspeicheldrüse extrahiert und kam 1930 als Pharmakon unter der Bezeichnung Padutin[®] auf den Markt.

Werle (89) beobachtete Anfang der 30er Jahre, daß durch Spaltung eines aus dem Pankreassaft stammenden Präkallikreins mit Trypsin Kallikrein entsteht. Durch Einwirkung von Kallikrein auf Serum wird eine vasoaktive Substanz gebildet. Sie wurde im Jahre 1961 von Werle (91) isoliert und Kallidin genannt. Dies führte zu der Erkenntnis, daß Kallikrein ein Enzym ist, das aus dem inaktiven α_2 -Globulin-Kallidinogen das kreislaufaktive Kallidin bildet.

Rocha e Silva (56) fand durch Behandlung von Serum mit Trypsin oder Schlangengift eine weitere blutdrucksenkende

Substanz, das Bradykinin. In der Folge wurden mehrere Substanzen mit ähnlicher pharmakologischer Wirkung und ähnlichem chemischen Aufbau entdeckt, die man als Gruppe der kreislaufaktiven "Kinine" zusammenfaßte. Ihre Vorstufen wurden "Kininogene", die sie bildenden Enzyme "Kallikreine" und die sie abbauenden Enzyme "Kininasen" genannt. Als in den 60er Jahren bewiesen wurde, daß die drei wichtigsten Kinine Bradykinin, Kallidin und Methionylkallidin chemisch verwandt sind (Abb. 2), begann man die Kallikreine in Plasmakallikreine und Organkallikreine zu unterteilen. Man fand heraus, daß Plasmakallikreine z.B. Lysyl-Arginyl-Bindungen hydrolysiert, wobei Bradykinin entsteht. Organkallikrein, wie z.B. das Pankreaskallikrein, spaltet Methionyl- Lysyl-Bindungen und bildet Kallidin (16).

Die Bedeutung der Kinine als wichtigste Substanzen für die Erhaltung der Homöostase bei Mensch und Tier wurde erkannt.

I	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Bradykinin
II	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Kallidin
III	Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Methionylkall

Abb. 2 Die drei wichtigsten Kinine (nach Werle, 1972) (92)

Nachdem Ende der 60er Jahre von der Firma Bayer AG ein 100 mal reineres Präparat von Kallikrein als bisher auf den Markt gekommen war, begannen viele Forschungsteams mit der Untersuchung der Wirkungen des Kallikreins auf die verschiedenen Körperfunktionen.

1.1.2. Erforschte Mechanismen

Kallikreine sind Enzyme, sogenannte Kininogenasen, die aus den im Serum und in den Geweben vorkommenden Kininogenen, die zur Gruppe der α_2 -Globuline gehören, Kinine freisetzen. Man teilt sie in unspezifische und spezifische Kallikreine ein.

Zu den unspezifischen Kallikreinen gehören Trypsin, Plasmin, Akrosin und Kathepsin D, das in den Leukozyten vorkommt (24).

Bei den spezifischen Kallikreinen unterscheidet man ein Organ-Kallikrein mit einem Molekulargewicht von 27.000 bis 35.000, das in Pankreas, Speicheldrüsen, Darm und Niere vorkommt, vom Plasma-Kallikrein mit einem Molekulargewicht von 100.000. Die Organ-Kallikreine spalten LMW (light-molecular-weight)-Kininogene (Molekulargewicht ca. 50.000), wobei Kallidin entsteht. Bei der Spaltung der HMW- (heavy-molecular-weight)-Kininogene (Molekulargewicht ca. 75.000) durch Plasma-Kallikrein wird Bradykinin gebildet.

Das Organ- bzw. Gewebs-Kallikrein (E.C. 3.4.21.8) besteht aus einer A-Kette mit 80 und einer B-Kette mit 152 Aminosäuren (87). Es wandelt Kininogen in Kallidin um (Abb. 3).

Kallikrein wird gebildet durch die Hydrolyse der inaktiven Vorstufe Präkallikrein. Während das Gewebs-Kallikrein durch Spaltung des Präkallikreins mit Trypsin entsteht, wird das Plasma-Kallikrein durch die Spaltung des Präkallikreins mit dem Hageman-Faktor (Faktor XII des Blutgerinnungssystems) gebildet. Dieser Hageman-Faktor wird einerseits durch Präkallikrein und Kininogene aktiviert, andererseits durch Kininabbauprodukte, die aus histidinreichen Polypeptiden bestehen, gehemmt.

H₂N---Gly-Arg-Met¹/₁Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg¹/₁Ser-Val

Kininogen (Teilsequenz)

Pankreas-Kallikrein



Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Kallidin

Abb. 3 Darstellung von Kallidin aus Kininogen

Die Kinine sind die eigentlichen Effektoren des Kallikrein-Kinin-Systems. Ihre Hauptvertreter Bradykinin, Kallidin und Methionyl-Kallidin erweisen sich als hochaktive Peptide mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von ca. 45 Sekunden. Ihre verschiedenen Wirkungen wurden mit Hilfe des Pankreas-Kallikreins (Padutin[®]) indirekt erforscht.

So ist auf ihre gefäßerweiternde Wirkung hinzuweisen, die in einem Blutdruckabfall zum Ausdruck kommt. Diese Wirkung wurde in der Haut (90), im Muskel (22), im Gehirn (22) und im Mesenterium (45) festgestellt. Sie wird auf die durch Kinine hervorgerufene Freisetzung von Prostaglandinen im Gefäßendothel zurückgeführt.

Es ist auch eine Beschleunigung des Blutstromes feststellbar (48), die eine bessere Versorgung der Gewebe bedeutet. Die Erhöhung der Absorption von Glucose durch Kinine wurde von Meng und Haberland (44) gemessen. Ebenso fördert Kallikrein noch die Absorption von Aminosäuren, Nukleotiden (45), Wasser und Elektrolyten (14). Schließlich ist noch zu erwähnen, daß nach Kallikreingaben eine Steigerung der Zellproliferation (54, 55) beobachtet worden ist.

Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE bzw. Kininase II, E.C. 3.4.15.1.) ist wahrscheinlich der wichtigste physiologische Regulator der vom Kallikrein-Kinin-System und vom Renin-Angiotensin-System stammenden Peptide. Eine weitere Verknüpfung dieser beiden Systeme erfolgt durch Kallikrein, das aus Prorenin, einem inaktiven Vorenzym, Renin freisetzt (34). Dieser Umwandlungsprozeß findet offenbar nicht im Plasma, sondern in den Nieren statt. Denn Renin wird bei verminderter Nierendurchblutung im juxtaglomerulären Apparat der Nieren gebildet. Seine Freisetzung bewirkt, daß aus der inaktiven Vorstufe Angiotensinogen das aktive Decapeptid Angiotensin I entsteht. Aus diesem Peptid wird durch C-terminale Abspaltung von Histidyl-Leucin durch ACE das vasokonstriktorisch wirksame Angiotensin II gebildet (17) (Abb. 1). Angiotensin I kann auch durch das Enzym Angiotensinase A in des-Asp¹-Angiotensin I umgewandelt werden, das durch ACE zu Angiotensin III transformiert wird. Angiotensin III kann auch direkt aus Angiotensin II entstehen. Es regt die Steroidbildung in den Nebennieren an. Seine Hemmung führt wegen der Blockade des Renin-Angiotensin-Systems zu Blutdruckabfall (10).

Das Angiotensin-Converting-Enzyme ist bei den Mammaliern als spezifische Komponente in den Endothelzellen (9) und in anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Parenchym der Niere (49, 81) nachweisbar. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit zahlreichen Oligosaccharidsequenzen. ACE

ist ein Metalloprotein, das Zink kovalent gebunden enthält, wobei ein Mol ACE ein Mol Zink bindet. Dieses Metallion kann durch zweiwertige Kationen einschließlich Kobalt ersetzt werden (81).

Neben der Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II ist das Angiotensin-Converting-Enzyme noch für die Hydrolyse des vasodilatorisch wirksamen Bradykinins und anderer Kinine verantwortlich, indem es von diesen C-terminal das Dipeptid Phe-Arg abspaltet. Ferner verändert ACE die β -Kette des Insulins (7).

Die höchsten ACE-Aktivitäten wurden in der Lunge (26, 49) und in den Hoden- und Nebenhodengewebe (32, 13) gefunden. Geringere Aktivitäten wiesen die Gewebe des Gastrointestinaltraktes und der Niere aller Species mit Ausnahme der Ratte auf (49). Schließlich enthält das Blutserum noch nennenswerte ACE-Aktivitäten, die jedoch bei bestimmten Erkrankungen unterschiedlich hoch sind (72). Patienten mit Lungensarcoidose (1), Lepra, Morbus Gaucher, akuter Virushepatitis und Leberzirrhose haben höhere ACE-Aktivitäten als Gesunde. Bei der Lungenfibrose, dem Lungenkarzinom, der Lungentuberkulose, dem Bronchialasthma und der Schocklunge sind die Enzymaktivitäten im Serum erniedrigt (42, 72, 75, 76). Eine Erhöhung der ACE-Aktivität findet sich auch bei manchen Hypertonikern. Sie werden mit Captopril, einem spezifischen ACE-Inhibitor (49), behandelt.

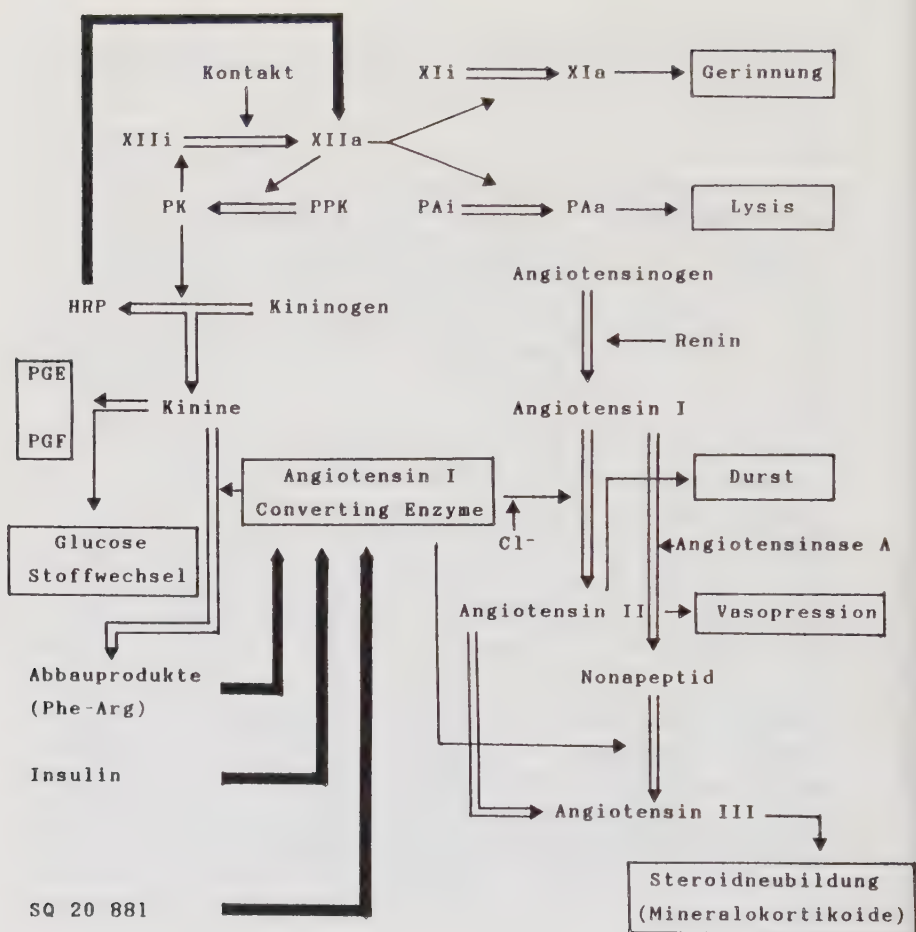
1.1.3. Regulatorische Bedeutung

Die Aktivierung des Plasma-Kallikreins erfolgt durch den Hageman-Faktor, der durch die Abbauprodukte der Kinine gehemmt wird. Aufgrund dieser Hemmung greifen das Kallikrein-Kinin-System und das Renin-Angiotensin-System indirekt in das Blutgerinnungs- und Lysissystem ein, da in diesen

Systemen der Faktor XII an der Bildung verschiedener Enzyme beteiligt ist.

Kallikrein wandelt Prorenin in Renin um und reguliert somit auch das Renin-Angiotensin-System (34). Die durch das Angiotensin-Converting-Enzyme entstehenden Spaltprodukte der Kinine üben eine negative Rückkopplung auf dieses Enzym aus. Sie wirken deshalb indirekt auf das Renin-Angiotensin-System ein und bilden somit eine weitere Verknüpfung des Kallikrein-Kinin-Systems mit dem Renin-Angiotensin-System. Das Angiotensin-Converting-Enzyme, das in diesen beiden Systemen eine zentrale Rolle einnimmt, wird auch durch Insulin gehemmt, das damit beide Systeme beeinflusst (7).

Die Regulation des Blutdrucks erfolgt u.a. durch das Kallikrein-Kinin-System und das Renin-Angiotensin-System (15), da einerseits Angiotensin II der bekanntlich stärkste Vaso-konstriktor ist, und andererseits Kinine vasodilatorisch wirken. Durch Zunahme der ACE-Aktivität steigt der Blutdruck an, da vermehrt Angiotensin II gebildet wird und Kinine abgebaut werden. Ebenso wird die Synthese von Angiotensin III gefördert, was zu einer gesteigerten Ausschüttung von Steroiden in der Nebenniere führt (10). Die regulatorische Verknüpfung des Kallikrein-Kinin-Systems mit dem Renin-Angiotensin-System zeigt Abbildung 4.



HRP = Histidin rich polypeptid

PA = Proaktivator

PG = Prostaglandin

PK = Plasmakallikrein

PPK = Plasmaprækallikrein

SQ 20 881 = Inhibitor des Angiotensin I Converting Enzyme

==> Umwandlung

—> fördernd

—> hemmend

Abb. 4 Synopsis der Esteroproteinasen (nach Haberland)

1.2. Das Kallikrein-Kinin-System und die menschliche Fortpflanzung

1.2.1. Die Bedeutung bei der Frau

Senior (74) hat herausgefunden, daß das Kallikrein-Kinin-System am Geburtsprozeß beteiligt ist. Veränderungen im Östrogen-Progesteron-Spiegel lassen den Kininogengehalt des Plasmas merklich ansteigen. Im Tierversuch wurde nachgewiesen, daß durch Kallikreingaben sich die Dauer der Schwangerschaft und der Geburt verlängern läßt (74).

1.2.2. Das Kallikrein-Kinin-System und die Fertilitätsstörungen beim Mann

Die dominierenden Symptome der idiopathisch bedingten Infertilität des Mannes sind die gestörte Spermatozoenmotilität (Asthenozoospermie) und die reduzierte Zahl an Spermatozoen (Oligozoospermie: Spermatozoendichte ist kleiner als 40 Millionen pro Milliliter).

Als erster hat Stüttgen (85) festgestellt, daß bei einigen Patienten, die mit Depot-Padutin (= Schweinepankreas-Kallikrein) behandelt worden sind, die Spermatozoenzahl angestiegen ist. Diese Steigerung ist möglicherweise auf die Wirkung des Kallikreins und der Kinine auf die Sertoli-Zellen des Hodens zurückzuführen, die den Stoffwechsel zwischen dem Organismus und den Samenzellen vermitteln. Nach Kallikreingaben ist eine Vergrößerung der Sertoli-Zellen zu beobachten (57). Neben der Beeinflussung der Sertoli-Zellen ist auch eine direkte Wirkung des Enzyms auf die Gonozyten denkbar (58).

Den Einfluß des Kallikreins und der Kinine auf die Spermatozoenbeweglichkeit untersuchten Schill und Haberland im

Jahre 1974 (61, 62, 63). Sie stellten fest, daß neben der quantitativen Spermatozoenbeweglichkeit auch die qualitative (Propulsion) durch Kallikreingaben verbessert werden kann. Die Ursachen dieser Motilitätssteigerungen sind vermutlich Permeabilitätsveränderungen an der Spermatozoenzellmembran oder der direkte Einfluß der Kinine auf die Transportprozesse.

Wallner demonstrierte den Zusammenhang zwischen der Spermienmotilität und der Zervixmukuspenetration (88), die in Gegenwart von Kallikrein signifikant anstieg (53).

Die Wirkungen des Kallikreins auf die Spermatozoen untersuchte Schill in der klinischen Anwendung des Enzyms. Nach der Applikation von täglich 600 KE Padutin® 100 über sieben Wochen zeigte sich bei infertilen Männern mit Asthenozoospermie ein Anstieg der Spermatozoengesamtzahl und eine Zunahme der Zahl der beweglichen Spermatozoen (35). Bei Männern mit Oligozoospermie war nach der Kallikreinbehandlung (3 x wöchentlich 40 KE i.m.) eine Zunahme der Spermatozoenzahl und eine Steigerung der Spermatozoenbeweglichkeit zu beobachten (65). Nach der Therapie der beiden Infertilitätsursachen war eine signifikante Erhöhung der Konzeptionsrate feststellbar. Die Indikation der systematischen Kallikreinbehandlung ist bei Asthenozoospermie, Oligozoospermie und bei Teratozoospermie gegeben, wo die Zahl der normal konfigurierten Spermatozoen reduziert ist und eine Motilitätsstörung besteht (64, 66, 67, 68).

Die Untersuchungen anderer Forscher zeigten, daß im Seminalplasma Gewebs-Kallikrein in höherer Konzentration vorhanden ist als im Blutserum. Es wird vor allem von der Prostata und den Nebenhoden aktiv sezerniert (19, 20).

Die elementaren Wirkungsmechanismen des Kallikrein-Kinin-Systems und des Renin-Angiotensin-Systems in Hinblick auf

die Fertilität des Mannes müssen noch genauer untersucht werden. Jedenfalls ist auffällig, daß bestimmte Enzyme, wie z.B. Renin (11) oder das Angiotensin-Converting-Enzyme (30, 31, 49) sehr hohe Aktivitäten im Seminalplasma aufweisen.

1.3. Die Nachweismethoden für das Angiotensin-Converting-Enzyme

Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE; Kininase II; E.C. 3.4.15.1.), das wichtigste Enzym des Renin-Angiotensin-Systems hat als physiologische Substrate Angiotensin I und Bradykinin. Durch Abspaltung des Dipeptids Histidyl-Leucin entsteht aus dem Angiotensin I das vasokonstriktorisch wirksame Angiotensin II. Bradykinin wird durch C-terminale Abspaltung des Restes Phenylalanyl-Arginin inaktiviert.

Aus diesen beiden physiologischen Reaktionen sind viele Meßmethoden zur Bestimmung der ACE-Aktivität entwickelt worden. Es stehen biologische, radiochemische, physiochemische sowie neuerdings immunologische Methoden zu Verfügung.

Zur Bestimmung der ACE-Aktivität mit radiochemischen Methoden werden die Peptide Bradykinin und Angiotensin I radioaktiv markiert. Bradykinin wird in das Substrat $\text{B-}\langle\text{Phe-}^3\text{H}\rangle\text{-Bradykinin}$ umgewandelt, von dem das markierte Dipeptid $\langle\text{Phe-}^3\text{H}\rangle\text{-Arg}$ abgespalten wird. Dessen Aktivität wird in einem β -Counter gemessen (59). Angiotensin I ist mit Jod-125 markiert und wird durch ACE in $^{125}\text{J-Angiotensin II}$ transformiert. Mittels Elektrophorese kann man Substrat und Produkt auftrennen und die Radioaktivität in einem γ -Counter messen (50). Ryan (60) verwendete $\langle^3\text{H}\rangle\text{-Hip-Gly-Gly}$ als Substrat. Die abgetrennte Hippursäure $\langle^3\text{H}\rangle\text{-Hip}$ wird mit Ethylacetat aus dem Reaktionsgemisch extrahiert und in einem β -Counter gemessen.

Zur Bestimmung der ACE-Aktivität mit physiochemischen Methoden werden als Substrate Oligopeptide verwendet. ACE spaltet von diesen Dipeptiden ab, die mit chemischen und physikalischen Nachweismethoden quantitativ bestimmt werden. Einige Verfahren sind so abgeändert, daß statt dem abgespaltenen Dipeptid der Rest des Oligopeptids chemisch oder physikalisch gemessen wird. Piquillourd (51) verwendet als Substrat Z-Phe-His-Leu (Z = Benzyloxycarbonyl), von dem ACE das Dipeptid His-Leu abspaltet. Dieses Dipeptid wird mit Orthophtaldialdehyd versetzt und anschließend fluorometrisch erfaßt. Friedland (23) gebrauchte statt Z-Phe-His-Leu das Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin. Weitere biochemische Nachweismethoden können mit den Substraten t-BOC-Phe(NO₂)-Phe-Gly (t-BOC = tert-Butyloxycarbonyl) (93), Z-Phe(NO₂)-His-Leu, Z-Phe(NO₂)-Gly-Gly und Hip-(NO₂)-Gly-Gly durchgeführt werden. Hier wird bei bestimmten Wellenlängen die Rate der Hydrolyse aus der Differenz der Absorptionen aus Substraten und molaren Äquivalenten der entstehenden Produkte bestimmt (84). Die ACE-Aktivität kann auch mit dem Substrat Hip-Gly-Gly ermittelt werden. Dabei wird das Dipeptid Gly-Gly abgespalten, das man anschließend mit Ninhydrin reagieren läßt. Die Konzentration des entstehenden Produktes wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen (93).

Eine sehr häufig angewandte Nachweismethode haben Cushman und Cheung (12) entwickelt. Sie verwendeten das synthetische Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin, das ACE in L-His-L-Leu und Hippursäure spaltet. Die freiwerdende Hippursäure wird mit Ethylacetat extrahiert und ihre Konzentration spektralphotometrisch bei 228 nm bestimmt (Abb. 5). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß weder das Substrat noch die abgespaltene Hippursäure durch andere Enzymaktivitäten zerstört werden. Es wird immer die wahre Enzymaktivität gemessen, auch wenn das Dipeptid L-His-L-Leu durch andere proteolytische Aktivitäten hydrolysiert werden

sollte (12).



Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin

+ H₂O

Abb. 5 Hydrolyse des Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin durch das Angiotensin-Converting-Enzym

Der immunologische Nachweis von ACE ist ebenfalls möglich. Dazu müssen allerdings Antikörper gegen ACE gewonnen werden, wofür wiederum reines ACE als Antigen verfügbar sein muß. Die Aussagekraft solcher immunologischer Methoden, die es bereits gibt (77), ist beschränkt, da nicht zwischen aktiven und inaktiven Molekülen unterschieden werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) - Aktivität im Seminalplasma

2.1.1. Radiologische Bestimmung von ACE

Dieser Test wurde nach Ryan (60) mit dem radioaktiven Substrat $\langle^3\text{H}\rangle$ -Hip-Gly-Gly (Fa. Paesel) durchgeführt. Die Gesamtaktivität des Substrats (50 μl) betrug 50 μCi ($1,11 \times 10^6$ DPM) und sollte nach Angaben des Herstellers für 500 Proben ausreichen. Da 50 μl verdünntes Substrat pro Test eingesetzt werden mußten, betrug die Gesamtaktivität eines Ansatzes $2,22 \times 10^5$ DPM. Dazu wurden 10 μl Substrat in 5 ml Puffer (0,1 M K_2HPO_4 , 0,3 M NaCl, pH = 8,3) des Puffersystems I gegeben. Das Seminalplasma stammte von Patienten der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Universitätsklinik München. Die Ejakulate wurden nach der Verflüssigung (= nach zwei Stunden) drei Minuten mit der Eppendorf-Tischzentrifuge ($16.000 \times g$, 22°C) zentrifugiert. Bei diesen Bedingungen war eine Sedimentation der Membranvesikel, genannt Prostatosomen, nicht zu erwarten. Das zentrifugierte Seminalplasma wurde mit Puffer (Puffersystem II: 0,5 M K_2HPO_4 , 1,5 M NaCl, pH 8,3) zur Herstellung einer Verdünnungsreihe versetzt.

Testansatz:

In Reagenzgläser (Glas, 10 ml) wurden jeweils 200 μl des Puffersystems I, 50 μl verdünntes Substrat (s.o.) und 50 μl verdünntes Seminalplasma gegeben. Die Testansätze wurden bei 37°C inkubiert. Nach 60 Minuten wurde die Enzymreaktion mit 1 ml 0,1 N HCl gestoppt. Zwei Proben enthielten statt 50 μl verdünntes Seminalplasma 50 μl Puffer (II) und 1 ml 0,1 N HCl. Diese Leerwerte wurden nicht mit HCl gestoppt, da vor der Inkubation HCl zugegeben worden war. Nachdem die Enzymreaktion gestoppt worden war, wurde in

jedes Röhrchen 1 ml Ethylacetat (Merck, p.a.) pipettiert. Die Röhrchen wurden fünf Sekunden durchgemischt (Vortex, Stufe 6) und fünf Minuten zentrifugiert ($800 \times g$, 22°C). Von der Ethylacetatphase wurden 300 μl in Szintillationsgefäße (Material: Polyethylen) pipettiert, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Packard: Scintillation Tm 299 Cocktail) versetzt und sorgfältig durchmischt. Anschließend wurden die Counts per minute (CPM) in einem β -Counter (Fa. Packard, Tri-Carb Modell 3380 Liquid-Scintillation-Spectrometer) gemessen.

Die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 6 dargestellt.

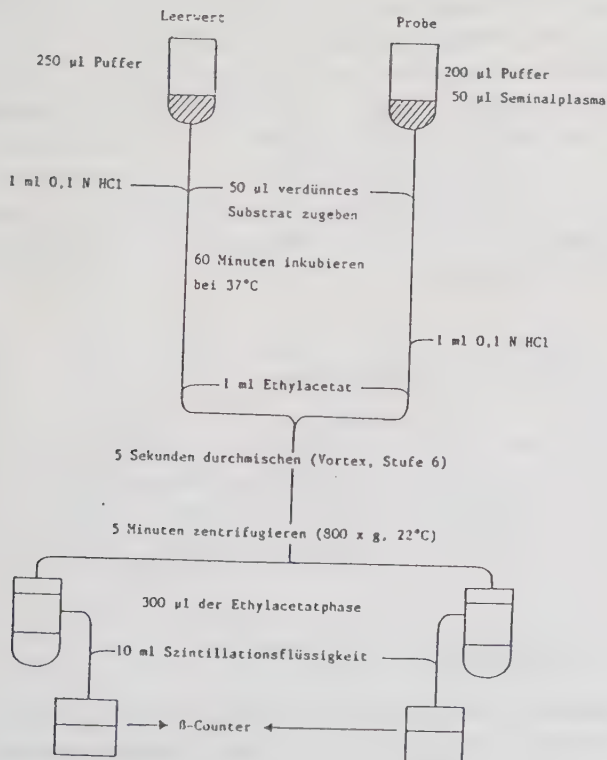


Abb. 6 Schema der Versuchsdurchführung

2.1.2. Bestimmung der Angiotensin-Converting-Enzyme-Aktivität mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin

Für diesen Test nach Cushman und Cheung (12) wurde das synthetische Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (HHL) (Fa. Bachem) verwendet. Als Modifikation wurde der Zusatz von 2,5 Vol.% n-Butanol eingeführt (26).

2.1.2.1. Herstellung des Substrats

Es wurden 46,6 mg HHL abgewogen und in 4 ml 25 mM NaOH aufgelöst (= HHL-Lösung). Zur Herstellung des Substrats wurde Puffer des Puffersystems II (0,5 M K_2HPO_4 , 1,5 M NaCl, pH 8,3) mit HHL-Lösung und Wasser im Verhältnis 1 : 1 : 2,8 vermischt und mit 265 μ l n-Butanol (Merck; p.a.) pro 10 ml Lösung veretzt. Das fertige Substrat hat folgende Zusammensetzung: 300 mM NaCl, 100 mM K_2HPO_4 , 5 mM Hip-L-His-Leu und 2,5 Vol.% n-Butanol. Bei einer 2,5 volumenprozentigen n-Butanolkonzentration werden His-Leu-Peptidasen gehemmt und außerdem die ACE-Aktivität gesteigert (26). Abbildung 7 zeigt diese Zusammenhänge.

2.1.2.2. Seminalplasmaaufbereitung

Das Seminalplasma wurde wie in 2.1.1. beschrieben aufbereitet. Da die ACE-Aktivität des Seminalplasmas sehr hoch ist, mußten Verdünnungen hergestellt werden. Dazu wurde als Lösungsmittel das Puffersystem II verwendet.

2.1.2.3. Durchführung des Tests (Abb. 8)

In Reagenzgläser (Glas, 10,0 ml) wurden 240 μ l Substrat und 10 μ l Seminalplasma pipettiert. Zwei Gläser enthielten

250 μ l Substrat und 250 μ l 1 N HCl und dienten als Leerwerte. Die Proben wurden gut gemischt (Vortex, Stufe 6) und 30 Minuten bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 250 μ l 1 N HCl gestoppt (mit Ausnahme der Leerwerte) und mit 1,5 ml Ethylacetat (Merck, p.a.) versetzt. Der Inhalt der Gläser wurde vermischt (Vortex, 5 sec., Stufe 6). Danach wurden die wäßrige und die Lösungsmittelphase durch Zentrifugation (800 x g, 5 min, 22° C) voneinander getrennt. Von der organischen Phase (Ethylacetat) wurde 1 ml in ein Reagenzglas abpipettiert und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand (Hippursäure) wurde in 1 ml Wasser aufgelöst. Die Extinktion dieser Lösung wurde in einem Spektralphotometer (Beckman DB) bei einer Wellenlänge von 228 nm und einer Schichtdicke von 1 cm in Quarzküvetten (Mikroküvetten, 1,0 ml Volumen) gemessen.

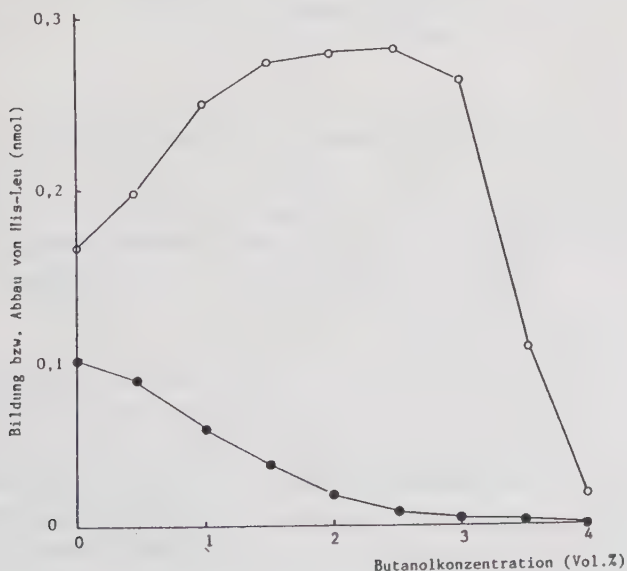


Abb. 7 Wirkung von verschiedenen n-Butanol-Konzentrationen auf die Bildung von His-Leu durch ACE (●—●), das aus einem Leberextrakt stammte, und den Abbau von His-Leu (0,26 nmol) durch unspezifische Peptidasen (○—○).

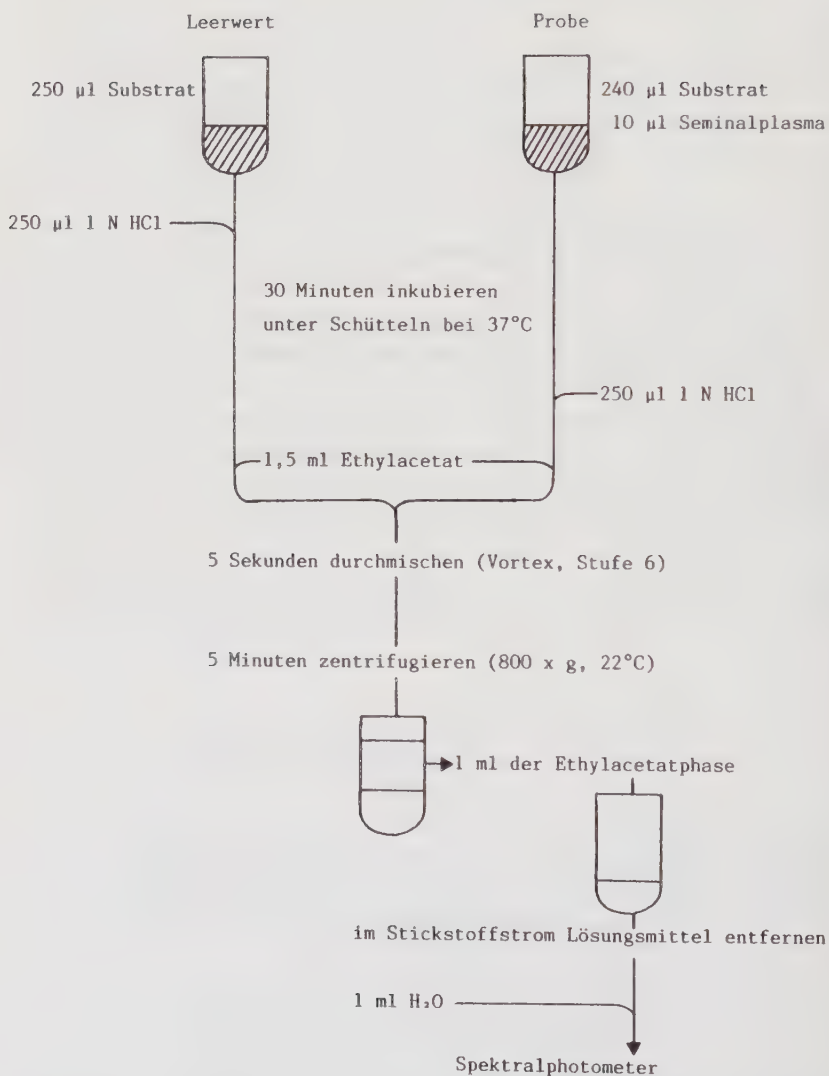


Abb. 8 Versuchsdurchführung mit dem Substrat Hip-L-His-L-Leu

2.1.3. Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Angiotensin-Converting-Enzyme-Bestimmung im humanen Seminalplasma mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin

2.1.3.1. Linearität

Definition:

Eine lineare Beziehung zwischen zwei Wertegruppen ($x_1 \dots x_n$; $y_1 \dots y_n$) besteht dann, wenn jedem Wert x_n ein Wert y_n zugeordnet werden kann, so daß die Gleichung $y = ax + B$ erfüllt ist. Graphisch ergeben die Wertepaare ($x_1 \dots x_n$; $y_1 \dots y_n$) eine Gerade, deren Steigung a ist und deren Schnittpunkt mit der y -Achse bei $y = B$ liegt.

In dieser Versuchsreihe wurde geprüft, ob zwischen der Seminalplasmakonzentration, d.h. der ACE-Aktivität, und der Konzentration der umgesetzten Hippursäure eine lineare Beziehung besteht.

Es wurden Verdünnungsreihen von vier verschiedenen Seminalplasmen mit Puffer (Puffersystem II) hergestellt, die folgende Zusammensetzung hatten: 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:11, 1:21 (Seminalplasmavolumen : Gesamtvolumen). Die Testansätze bestanden wie in 2.1.2.3. beschrieben aus 240 μ l Substrat und 10 μ l Seminalplasmaverdünnung.

2.1.3.2. Reproduzierbarkeit

Definition:

Die Reproduzierbarkeit eines Tests ist gegeben, wenn er bei n -facher Wiederholung unter gleichen Versuchsbedingungen zum selben Ergebnis führt.

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit des Tests zur Bestim-

mung der ACE-Aktivität mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin wurde von einem Seminalplasma mit Puffer (Puffersystem II) eine 1:11-Verdünnung hergestellt und die ACE-Aktivität mit 19 Testansätzen (wie in 2.1.2.3.) ermittelt.

2.1.3.3. Interassay-Genauigkeit

Definition:

Die Interassay-Genauigkeit eines Tests ist gegeben, wenn er nach einer Zeit t unter gleichen Versuchsbedingungen wiederholt zum selben Ergebnis führt.

Dazu wurde die ACE-Aktivität von 10 Seminalplasmaproben, die mit Puffer (Puffersystem II) 1:11 verdünnt waren, wie in 2.1.2.3. beschrieben, ermittelt. Nach vier Monaten wurden die ACE-Aktivitäten dieser Proben unter gleichen Voraussetzungen erneut gemessen. Die Lagerung der Seminalplasmaproben erfolgte in der Zwischenzeit bei -20°C ohne Zusätze.

2.1.4. Eigenschaften des Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma

2.1.4.1. Temperaturabhängigkeit

In diesem Versuch wurde die ACE-Aktivität eines Seminalplasmas bei 22°C und 37° bestimmt. Das Seminalplasma wurde mit Puffer (Puffersystem II) 1:3, 1:5, 1:11 und 1:21 verdünnt. Die ACE-Aktivität in diesen Verdünnungen wurden bei einer Inkubationstemperatur von 22°C bzw. 37°C bestimmt. Ansonsten wurde der Test durchgeführt, wie in 2.1 2.3. beschrieben ist.

2.1.4.2. Bestimmung der optimalen Substratkonzentration

In diesem Versuch wurde der Einfluß verschiedener Substratkonzentrationen auf die ACE-Aktivität untersucht.

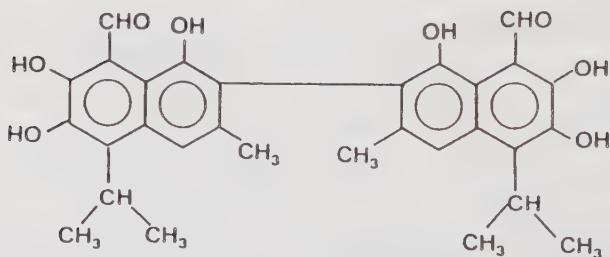
Dazu wurden zuerst Pufferlösungen mit Puffersystem II, Wasser, n-Butanol und HHL-Lösung herstellt, die folgende Konzentrationen hatten: 300 mM NaCl, 100 mM K_2HPO_4 , 2,5 Vol.% n-Butanol (v/v) und Hip-L-His-L-Leu (0,15 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,0 mM, 10,0 mM oder 15,0 mM). Mit diesen Substatkonzentrationen wurde der Versuch wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt, wobei für jede Substratkonzentration ein Leerwert bestimmt wurde, da ein gewisser Anteil des Hip-L-His-L-Leu im Substrat von Anfang an schon hydrolysiert gewesen sein konnte. Das verwendete Seminalplasma wurde mit Puffer (Puffersystem II) 1:5 verdünnt.

2.1.4.3. Hemmung der ACE-Aktivität mit Gossypol acetic acid

Gossypol acetic acid* (1,1',6,6',7,7'-Hexahydroxy-3,3'-Dimethyl-5,5'-Diisopropyl-2,2'-Binaphtalen-8,8'-Dialdehyd; MG 578,5; Fa. Sigma) ist ein Bestandteil des Baumwollsaamenöls. Schon zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde vor allem in China nach Verzehr dieses Öls Infertilität beobachtet. Diese Infertilität war nach Absetzen des Öls reversibel (40).

Da schon bekannt war, daß Gossypol acetic acid in der Lage ist, eine Reihe von Enzymaktivitäten zu hemmen, wurde in einer Versuchsreihe der Einfluß auf die Aktivität des ACE untersucht. Wegen der Wasserunlöslichkeit von Gossypol acetic acid wurden sowohl DMSO als auch N,N-Dimethylformamid als Lösungsvermittler eingesetzt.

* Strukturformel von Gossypol



2.1.4.3.1. DMSO als Lösungsvermittler

DMSO (Dimethylsulfoxid, C_2H_6OS ; Merck, p.a., 99,7%) wurde mit Puffer (Puffersystem II) im Verhältnis 1:5 gemischt. In 1 ml dieses Gemisches wurden 2,42 mg Gossypol acetic acid aufgelöst (= Stammlösung).

Testansatz:

In Reagenzgläser (Glas, 10 ml Volumen) wurden 230 μ l Substrat, 10 μ l Gossypol acetic acid Stammlösung und 10 μ l Seminalplasma, das mit Puffer (Puffersystem II) 1:5 verdünnt war, gefüllt. Zur Kontrolle der Aktivität wurden in zwei Gläser statt 10 μ l Gossypol acetic acid Stammlösung 10 μ l des oben genannten DMSO/Puffer II-Gemisches (1:5) gegeben und zwei weitere Gläser mit 240 μ l Substrat und 10 μ l Seminalplasmaverdünnung (s.o.) gefüllt. Die Inkubation und weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.1.2.3. beschrieben.

Um festzustellen, ob nicht DMSO selbst die ACE-Aktivität beeinflusst, wurde die ACE-Aktivität bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen gemessen. Dazu wurden Reagenzgläser mit 230 μ l Substrat, 10 μ l DMSO/Puffer II-Gemisch und 10 μ l Seminalplasma (1:5 verdünnt mit Puffersystem II) beschickt. Das DMSO/Puffer II-Gemisch wurde aus dem Puffersystem II und DMSO so hergestellt, daß der DMSO-Gehalt der einzelnen Testansätze 0%, 0,1%, 0,2%, ... , 1,0%, 1,2%, 1,6%, 2,0%, ... , 3,6% und 4% betrug. Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.1.4.3.2. N,N-Dimethylformamid als Lösungsvermittler

Zuerst wurde eine Stammlösung aus N,N-Dimethylformamid (Merck, p.a.), Puffer (Puffersystem II) und Gossypol acetic acid hergestellt. Dazu wurden in 300 μ l N,N-Di-methyl-

formamid 14 mg Gossypol acetic acid gelöst und 1,3 ml Puffer (Puffersystem II) langsam dazugegeben. Die Gossypol acetic acid Konzentration dieser Lösung betrug 15,1 mM, der N,N-Dimethylformamid-Anteil war 18,75 Vol.-%.

Diese Stammlösung wurde mit Puffer (Puffersystem II) verdünnt, daß eine Verdünnungsreihe mit folgenden Gossypol acetic acid Konzentrationen entstand: 0 mM, 0,25 mM, 0,50 mM, ... , 2,50 mM, 5,0 mM, ... , 15,0 mM.

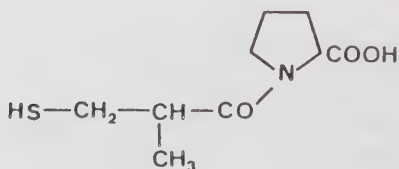
Testansatz:

In Reagenzgläser wurden 230 µl Substrat, 10 µl Gossypol acetic acid Lösung der Verdünnungsreihe und 10 µl Seminalplasma, das mit Puffer (Puffersystem II) 1:5 verdünnt war, gefüllt. Die Gossypol acetic acid Konzentrationen betrugen in den einzelnen Testansätzen 0 mM, 0,01 mM, 0,02 mM, ... , 0,1 mM, 0,2 mM, ... , 0,6 mM. Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben weitergeführt.

2.1.4.4. Hemmung der ACE-Aktivität mit Captopril

Captopril* (Lopirin[®], 1-(2S)-3-Mercapto-2-Methylpropionyl-L-Prolin; MG: 217,26; Fa. Squibb-Heyden) ist ein spezifischer Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyme (49).

* Strukturformel von Captopril



Es wird als Pharmakon gegen Hypertonie sowohl bei Renin-abhängigen als auch bei Renin-unabhängigen Formen eingesetzt. In der Dosierung von 60 -150 mg/die (30 - 150 mg/die) wird es mit anderen Pharmaka kombiniert. Captopril findet ebenso Anwendung bei den Formen der Herzinsuffizienz, die mit Herzglykosiden nicht therapiert werden können. Dieses Präparat darf nicht bei Autoimmunkrankheiten, Kollagenkrankheiten und bei eingeschränkter Nierenfunktion verordnet werden.

In diesem Versuch wurde untersucht, in welchem Maße Captopril die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme beeinflusst.

Dazu wurde zuerst eine Stammlösung aus Captopril und Puffer (Puffersystem II) hergestellt. Die Konzentration betrug 0,01 mg Captopril pro ml Puffer bzw. 46,0 μM . Von dieser Stammlösung wurden mit Puffer (Puffersystem II) Verdünnungen in Form einer geometrischen Reihe hergestellt, die folgende Konzentrationen aufwiesen: 46,0 μM , 23,0 μM , 11,5 μM , ... , $5,6 \times 10^{-3} \mu\text{M}$.

Testansatz:

Der Testansatz enthielt 230 μl Substrat, 10 μl Captopril-verdünnung (s.o.) und 10 μl Seminalplasma, das mit Puffer (Puffersystem II) 1:5 verdünnt war. Zwei Proben enthielten keinen Hemmstoff, damit die absolute ACE-Aktivität gemessen werden konnte. Die Captoprilkonzentrationen in den Testansätzen betrugen 1,8 μM , 0,92 μM , ... , $2,2 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ und 0 μM . Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.1.4.5. Hemmung der ACE-Aktivität mit EDTA

EDTA (Titriplex[®] III, Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2 H_2O$; Mg: 372,24; Merck, p.a.) ist ein Chelatbildner für Ionen der Übergangsmetalle. Es ist deshalb in der Lage Enzyme, die Metalloproteine sind, zu hemmen.

Da Angiotensin-Converting-Enzyme das Kation Zink äquimolar gebunden enthält, wurde in diesem Versuch untersucht, ob EDTA eine Hemmwirkung auf die Aktivität von ACE ausübt.

Zuerst wurde eine Stammlösung aus EDTA und Puffer (Puffersystem II) hergestellt, deren Konzentration 25 mM betrug. Diese Stammlösung wurde mit Puffer (Puffersystem II) so verdünnt, daß eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen entstand:

0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, ... , 2,5 mM, 5,0 mM, ... , 25 mM.

Testansatz:

Der Testansatz enthielt 230 µl Substrat, 10 µl EDTA-Verdünnung (s.o.) und 10 µl Seminalplasma, das mit Puffer (Puffersystem II) 1:5 verdünnt war. Zwei Proben war kein Hemmstoff zugesetzt, um die absolute ACE-Aktivität ermitteln zu können. Die EDTA-Konzentrationen in den Testansätzen betrugen 0 µM, 10 µM, 20 µM, ... , 100 µM, 200 µM, ... 1000 µM. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.1.2.3. beschrieben.

2.1.5. Verteilung von Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma

2.1.5.1. Untersuchungen von Membranvesikelfraktionen

2.1.5.1.1. Definition der "Prostasomen"

Als "Prostasomen" werden Membranvesikel bezeichnet (82), die nach Zentrifugation ($2.500 \times g$, 10 min, $22^\circ C$) des Ejakulates im Seminalplasma zurückbleiben. Sie stammen wahrscheinlich aus der Prostata und haben möglicherweise einen Anteil an der Spermatozoenbeweglichkeit (36). Ihr Gehalt an Calcium, Magnesium und Zink übertrifft den des Seminalplasmas um ein Vielfaches (82). Abbildung 9 zeigt die Ultrastruktur dieser Membranvesikel bei 95.500 facher Vergrößerung.

2.1.5.1.2. Isolierung der Membranvesikelfraktion

Ejakulate aus der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Universitätsklinik München wurden bei $2.500 \times g$ zentrifugiert (10 min, $22^\circ C$), um Spermatozoen und Rundzellen abzutrennen.

Das abgetrennte Seminalplasma wurde über eine Sephadex G 200 Säule mit 2,0 cm Durchmesser und 57,0 cm Höhe (35 ml Volumen) chromatographiert. Als mobile Phase wurde Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,32), der 138 mM NaCl und 1 mM $MgCl_2$ enthielt, verwendet.

Ein Teil des Seminalplasmas wurde in der präparativen Ultrazentrifuge ($38.000 \times g$, $2^\circ C$, 14 h) zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde im oben genannten Tris-Puffer aufgelöst und über die bereits beschriebene Sephadex G 200 Säule chromatographiert.

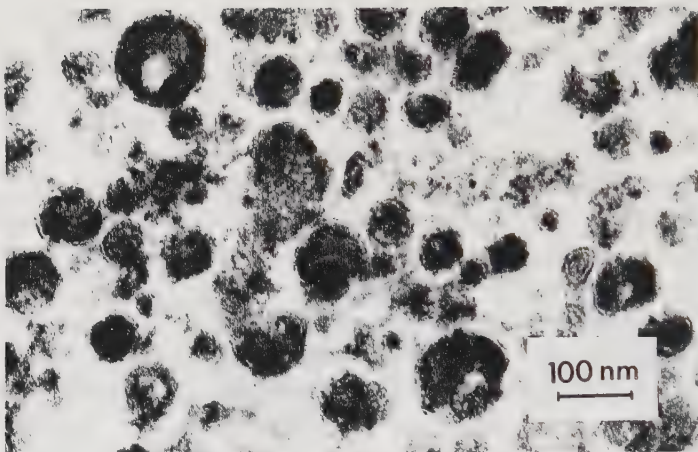


Abb. 9 Ultrastruktur von Membranvesikeln aus humanen Seminalplasma

Elektronenmikroskopie: Die Membranvesikelfraktion des humanen Seminalplasmas wurde bei 106.000 x g sedimentiert, in Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,32), der 138 mM NaCl und 1 mM MgCl₂ enthielt, suspendiert und erneut bei 106.000 x g zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde 30 Minuten in gepufferter Glutaraldehydlösung (1,0 % in Tris-HCl, 10 mM, pH 7,32) inkubiert und dann in Osmoniumtetroxid gestaint. Eingebettet in Epon-Araldit wurden Dünnschnitte von diesem auf Gold-grids montiert.

Die Extinktion der Eluate wurde bei 280 nm im Spektralphotometer ermittelt.

2.1.5.1.3. Bestimmung der ACE-Aktivität in der Membranvesikelfraktion

Die Aktivität des ACE wurde im Säuleneluat des chromatographierten Seminalplasmas (s. 2.1.5.1.2.) bestimmt.

Testansatz:

Der Testansatz bestand aus 240 µl Substrat und 10 µl Eluationsvolumen einzelner Membranvesikelfraktionierungen. Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.1.5.1.4. Hemmung der ACE-Aktivität in der Membranvesikelfraktion mit EDTA

In diesem Versuch wurde getestet, ob die in der Membranvesikelfraktion vorkommende ACE-Aktivität durch EDTA gehemmt werden könnte. Dazu wurde eine 2,5 mM EDTA-Lösung mit Puffer (Puffersystem II) hergestellt.

Testansatz:

Der Testansatz bestand aus 230 µl Substrat, 10 µl EDTA-Lösung und 10 µl Eluationsvolumen der in 2.1.5.1.3. durchgemessenen Membranvesikelfraktionierungen. Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.1.5.2. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit Normozoospermie

Es wurden 40 Ejakulate von Patienten mit Normozoospermie aus der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Universitätsklinik München auf ACE-Aktivität untersucht. Die Spermatozoendichte bei Normozoospermie bewegt sich zwischen 40 und 120 Millionen pro Milliliter. Geringere Dichten werden Oligozoospermie, höhere Polyzoospermie genannt.

Die Ejakulate wurden nach der Verflüssigung (= 2 Stunden) drei Minuten mit der Eppendorf-Tischzentrifuge (16.000 x g, 22° C) zentrifugiert. Das abgetrennte Seminalplasma wurde anschließend mit Puffer (Puffersystem II) 1:11 verdünnt.

Testansatz:

In Reagenzgläser (Glas, 10 ml Volumen) wurden 240 µl Substrat und 10 µl verdünntes Seminalplasma gefüllt. Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.1.5.3. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit Klinefelter Syndrom

Pathologie (71):

Das Klinefelter Syndrom stellt sich aus andrologischer Sicht als eine besondere Form des Hypogonadismus dar. Klinefelter Syndrom ist die Bezeichnung für ein Krankheitsbild bei phänotypisch männlichen, aber infertilen Patienten mit einem XXY-Geschlechtschromosomen-Satz. Mosaik sind in der Literatur beschrieben worden.

Das klinische Erscheinungsbild ist gekennzeichnet durch doppelseitige Gonadenhypoplasie, Aspermie, Gynäkomastie und eine erhöhte Gonadotropin-Ausschüttung. Voraussetzung für

die positive Diagnose ist die Geschlechtschromosomen-Konstellation XXY.

Histologisch zeigen sich Gewebsveränderungen im Hoden, wobei die Degeneration der Tubuli seminiferi am auffälligsten ist.

Manchmal zeigt sich bei Klinefelter Patienten eine völlig normale Spermiogenese. Da aber diese Patienten infertil sind und im Ejakulat regelmäßig Azoospermie diagnostiziert wird, muß eine Entwicklungsanomalie im Bereich der ableitenden Samenwege bestehen, die den Weitertransport der gebildeten Spermatozoen verhindert.

Wegen der Gefahr einer durch Steroidmangel bedingten Osteoporose müssen Klinefelter Patienten androgensubstituiert werden.

Testansatz:

In dieser Versuchsreihe wurden Seminalplasmen von 12 Patienten mit nachgewiesener XXY-Geschlechtschromosomen-Konstellation auf ihre ACE-Aktivität untersucht. Die Durchführung des Tests erfolgte wie in 2.1.2.3. beschrieben. Die Seminalplasmen wurden mit Puffer (Puffersystem II) 1:11 verdünnt.

2.1.5.4. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Pathologie:

Chronische Prostatitis (3):

Die chronische Prostatitis ist eine blande, afebril verlaufende chronische Entzündung der Vorsteherdrüse. Häufig ist sie Restzustand einer akuten Prostatitis. Sie kann jedoch auch kanalikulär ascendierend oder hämatogen entstehen und durch grampositive oder gramnegative Bakterien verursacht werden (29). Symptomatisch sind ein leichtes Spannungs- und Druckgefühl in der Darmgegend, das in den Hoden- und Leistenbereich ausstrahlt. Ebenso finden sich Kreuzschmerzen, Kälteempfindlichkeit und Störungen der Sexualfunktion. Diese Entzündung wird durch den Nachweis von Entzündungszellen und Bakterien im Exprimat der Prostata oder im Ejakulat diagnostiziert. Therapiert wird diese Erkrankung durch Aktivierung der lokalen und allgemeinen Abwehrlage mit Reizkörpern, durch Antibiotika bei Erregernachweis und durch Behandlung der Symptome.

Entzündung der Bläschendrüse (2):

Es handelt sich hier um eine akute Entzündung der Bläschendrüsen, die durch Bakterien verursacht wird. Bei rektaler Untersuchung findet sich seitlich und etwas über der Prostata eine stark druckempfindliche, wulstförmige Schwellung. Bei blandem und afebrilem Verlauf enthält das Ejakulat häufig Blut. Die Diagnose kann nur aus der Ejakulatuntersuchung gestellt werden.

Testansatz:

Es wurden in dieser Versuchsreihe insgesamt 70 Seminalplasma-
proben auf ihre ACE-Aktivität untersucht. Im Testansatz
befanden sich 240 µl Substrat und 10 µl Seminalplasma, das
mit Puffer (Puffersystem II) 1:11 verdünnt war. Die Ver-
suchsdurchführung erfolgte wie in 2.1.2.3. beschrieben.

2.1.5.5. Bestimmung der ACE-Aktivität in Split-Ejakulaten

Das humane Ejakulat enthält neben den Spermatozoen unter-
schiedliche Anteile der Sekrete aus den akzessorischen Ge-
schlechtsdrüsen (27).

Die zuerst erscheinenden Anteile des Ejakulates bestehen
aus dem dünnflüssigem Sekret der Cowper'schen Drüsen und
der Littre'schen Urethraldrüsen. Darauf folgt dünnflüssiges
Prostatasekret. Die Bestandteile der sich daran anschlie-
ßenden Fraktion stammen aus der Prostata, den Nebenhoden
(Spermatozoen) und der Bläschendrüse, die dann noch als
Schlußfraktion ein fructosehaltiges (25), gallertartiges
Sekret ausstoßt.

Split-Ejakulate, die in zwei Fraktionen gewonnen werden,
haben in der ersten Phase hauptsächlich Prostata- und
Nebenhodensekret, während sich die zweite Phase zum großen
Teil aus dem Sekret der Bläschendrüse zusammensetzt.

Testansatz:

In diesem Versuch wurden 19 Split-Ejakulate, die in zwei
Fraktionen gewonnen worden waren, auf ACE-Aktivität unter-
sucht. Von den Ejakulaten wurde, wie in 2.1.1. beschrieben,
das Seminalplasma abgetrennt, das mit Puffer (Puffersystem
II) 1:11 verdünnt wurde. Der Testansatz setzte sich aus
240 µl Substrat und 10 µl verdünntem Seminalplasma zusam-

men. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.1.2.3. beschrieben.

2.1.5.6. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten vor und nach Vasektomie

Vasektomie ist eine operative Kontrazeptionsmethode des Mannes. Nach einem Skrotalschnitt werden beide Samenleiter durchtrennt und unterbunden. Diese Methode bedeutet meist den endgültigen Verlust der Zeugungsfähigkeit (4).

In diesem Versuch wurden Seminalplasmen von vier Patienten auf ACE-Aktivität getestet. Es wurden Seminalplasmaproben, die sowohl vor als auch nach der Vasektomie gewonnen waren, untersucht.

Testansatz:

In Reagenzgläser wurde 240 μ l Substrat und 10 μ l Seminalplasma, das mit Puffer (Puffersystem II) 1:11 verdünnt war, gegeben. Der Test wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.2. Bestimmung der ACE-Aktivität im Blutserum

Zu Vergleichszwecken wurde in dieser Versuchsreihe die ACE-Aktivität in Blutserumproben von Patienten aus der Dermatologischen Universitätsklinik München ermittelt. Es wurden die Proben eines männlichen und eines weiblichen Kollektives untersucht, wobei ein Serum von einer Patientin mit Sarkoidoseverdacht stammte.

Sarkoidose (8):

Sarkoidose ist eine Systemerkrankung, deren Ätiologie und Pathogenese noch unbekannt sind. Sie befällt bevorzugt Lymphknoten (v.a. mediastinale), Lunge, Leber und Haut (bei 40 - 50 %). Die Erkrankung tritt oft zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf. Ihr Verlauf kann akut, subakut oder chronisch sein, wobei im Frühstadium oft eine gutartige und rückbildende Tendenz zu beobachten ist. Im Spätstadium treten irreversible Fibrosen auf. Sind zu diesem Zeitpunkt auch Lunge und Leber beteiligt, ergeben sich für den Patienten folgenschwere Konsequenzen.

Histologisch sieht man Epitheloidgranulome, die anstelle des Bindegewebes auftreten.

Die Diagnose wird mit Hautbiopsie, Kveim-Test (= intrakutane Injektion von antigenem Extraktionsmaterial von Patienten mit Sarkoidose), Tuberkulinempfindlichkeitstest, Röntgen der Lunge, Leberfunktionsprüfung und Serumelektrophorese gesichert. Bei schwerer Erkrankung mit Lungenbeteiligung findet sich eine Erhöhung der Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme im Blutserum.

Die Therapie besteht bei den Verlaufsformen, die nicht zur Spontanheilung neigen, aus der Verordnung von Glukokorti-

koiden und ACTH. Daneben kann noch Chloroquin bei Haut- und Lungenveränderungen sowie Vitamin D bei ausgedehnten Hautsarkoidosen verordnet werden.

Testansatz:

Eine Versuchsreihe wurde mit unverdünntem Blutserum durchgeführt. In einer zweiten wurde etwa jedem siebten Blutserum noch der spezifische Inhibitor Captopril (vgl. 2.1.4.4.) zugegeben, um die durch Captopril hemmbare ACE-Aktivität zu ermitteln. In Reagenzgläser (Glas, 10 ml Volumen) wurden einmal 240 µl Substrat und 10 µl unverdünntes Blutserum gegeben, das andere Mal 230 µl Substrat, 10 µl Captopril-Lösung (0,72 mM in Puffer des Puffersystems II) und 10 µl unverdünntes Blutserum. Der Versuch wurde wie in 2.1.2.3. beschrieben durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Radiologische Bestimmung von ACE

In diesem Test wurde die vom Substrat $\langle^3\text{H}\rangle$ -Hip-Gly-Gly abgespaltene $\langle^3\text{H}\rangle$ -Hippursäure nach Protonierung mit Ethylacetat aus dem Testansatz extrahiert und anschließend die $\langle^3\text{H}\rangle$ -Aktivität im Szintillationszähler (β -Counter) gemessen (60).

In den Testansätzen zeigten sich für die Leerwerte (250 μl Puffer (I), 50 μl Substrat, 1 ml 0,1 N HCl) höhere oder ähnliche Zählwerte wie für die Proben mit Seminalplasma (250 μl Puffer (I), 50 μl Substrat, 50 μl Seminalplasma). Auch ansteigende Seminalplasma-Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:11, 1:21) brachten keine besser verwertbaren $\langle^3\text{H}\rangle$ -Zählraten.

Deshalb wurde eine zweite Versuchsreihe mit dem Substrat $\langle^3\text{H}\rangle$ -Hip-Gly-Gly, das von einer anderen Charge stammte, durchgeführt. Auch dabei wurde als Ergebnis gefunden, daß die Kontrollwerte gleiche oder auch höhere Zählausbeuten ergaben als die zu messenden Proben mit unterschiedlichen Seminalplasma-Verdünnungen.

Dies ist ein starker Hinweis, daß die Güte des Radioassay durch die offensichtliche Instabilität des Substrates stark beeinträchtigt wurde, d.h. das tritiierte Substrat war bereits zu Beginn der Messung in $\langle^3\text{H}\rangle$ -Hippursäure und Gly-Gly gespalten. Dadurch sind die in etwa gleich hohen Zählausbeuten bei den Leerwerten und Proben erklärt.

Man kann das so interpretieren, daß entweder die Protonierung (durch die HCl-Zugabe) schon zu einer Spaltung des Substrates führt, oder das Substrat bedingt durch seine Instabilität schon in Hippursäure und Gly-Gly gespalten war.

3.2. Bestimmung der Angiotensin-Converting-Enzyme-Aktivität mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin

3.2.1. Auswertung

Als eine Einheit (Unit) wurde diejenige Enzymaktivität definiert, die in einer Minute ein μmol Hippursäure aus Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin bei 37°C unter Standardbedingungen freisetzt.

Zur Berechnung wurde die von Cushman (12) angegebene Formel verwendet:

$$\langle A_{228} - A_{228}(\text{Leerwert}) \rangle \times 5,6 \times 10^{-3}$$

A_{228} : Extinktion bei 228 nm und 1 cm Schichtdicke

Der Umrechnungsfaktor $5,6 \times 10^{-3}$ setzt sich aus folgenden Parametern zusammen:

$$\epsilon_{228}(\text{Hippursäure}) = 9,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Anteil der Hippursäure, die mit Ethylacetat extrahiert worden ist = 0,91

Anteil des abpipettierten Ethylacetats = 0,67

Inkubationszeit = 30 min

Da stets mit Seminalplasmaverdünnungen (1:v) gearbeitet wurde und davon 10 μl im Test eingesetzt wurden, mußte der Faktor $v \times 100$ multipliziert werden, um die ACE-Aktivität pro ml und Minute ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) angeben zu können.

Beispiel:

$A_{228} = 0,5$; $A_{228}(\text{Leerwert}) = 0,2$; Seminalplasmaverdünnung = 1:11

$$\begin{aligned} \text{ACE-Aktivität} &= (0,5 - 0,2) \times 5,6 \times 10^{-3} \times 11 \times 100 = \\ &= 1,848 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1} \text{ (units} \times \text{ml}^{-1}) \end{aligned}$$

3.2.2. UV-Absorptionsspektren von Hippursäure und Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin

Die UV-Absorptionsspektren von Hippursäure und Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (jeweils 3 mM) sind in Abbildung 10 dargestellt. $\lambda_{\max}$ für Hippursäure befindet sich bei 228 nm. Bei dieser Wellenlänge ist die Extinktion für Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin kleiner als 0,1.

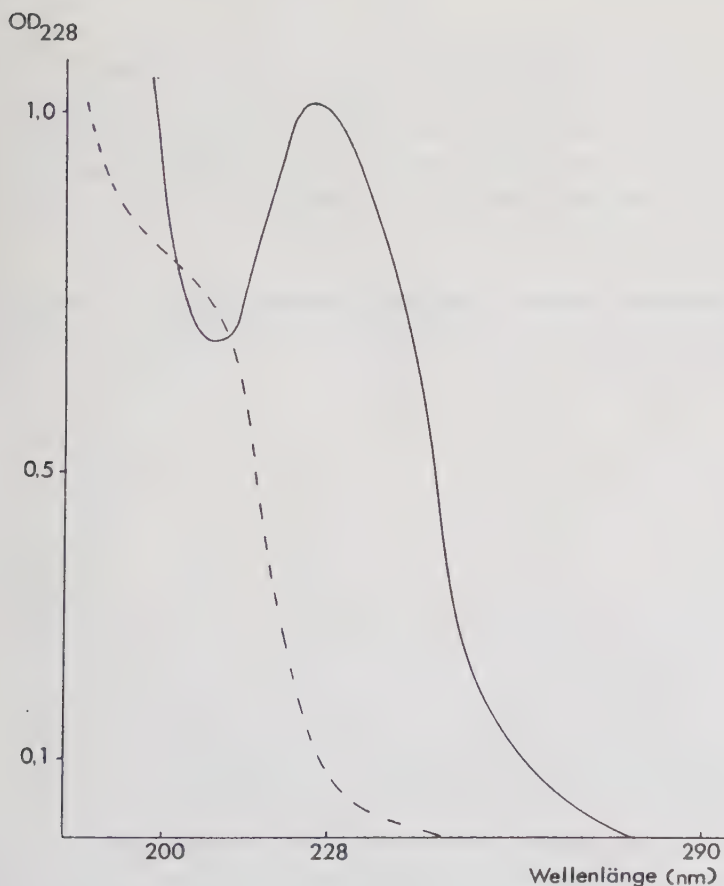


Abb. 10 UV-Absorptionsspektren von Hip-L-His-L-Leu (— — —) und Hippursäure (—) bei einer Konzentration von 3 mM

3.3. Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Angiotensin-Converting-Enzyme-Bestimmung im humanen Seminalplasma mit Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin

3.3.1. Linearität

In diesem Versuch wurden vier Seminalplasmaproben eingesetzt, die 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:11 und 1:21 verdünnt waren.

Wegen der hohen Aktivität des ACE im Seminalplasma waren bei zwei Proben die 1:1-Verdünnungen und bei den beiden übrigen Seminalplasmen auch die 1:2-Verdünnungen nicht zu verwerten. Bei den anderen Verdünnungen bestand eine lineare Beziehung zwischen der Seminalplasmaverdünnung und der gemessenen ACE-Aktivität (Abb. 11).

Das Ergebnis zeigte, daß eine Verdünnung von 1:11 für die Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma zweckmäßig ist.

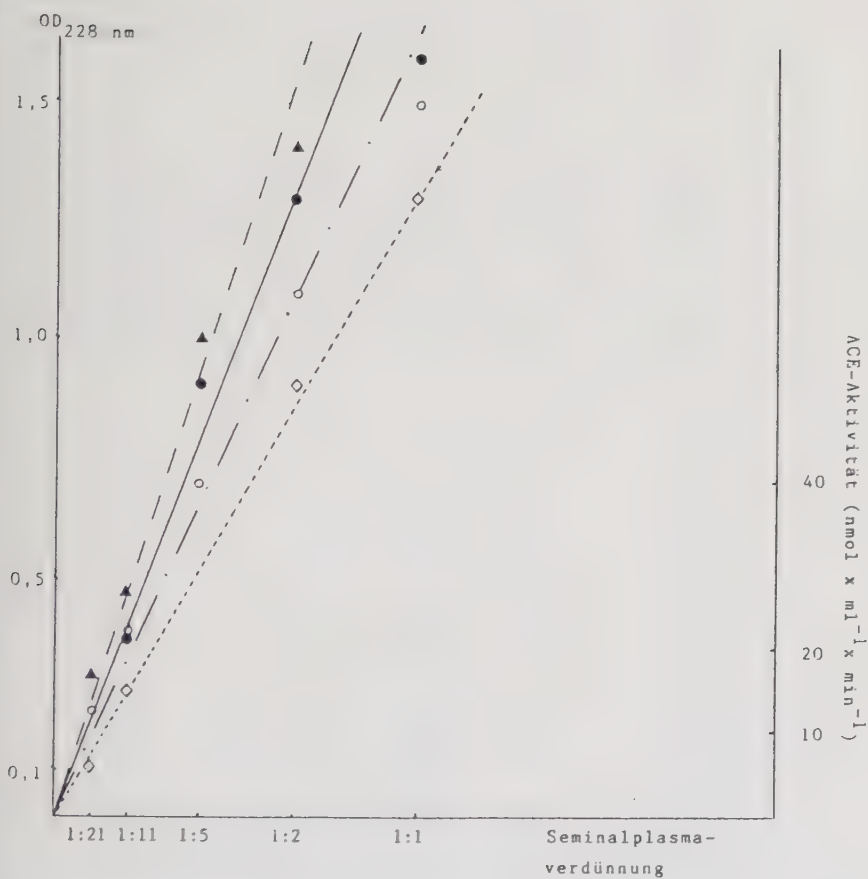


Abb. 11 Untersuchung der Linearität - ACE-Aktivität von vier verschiedenen Seminalplasmen bei unterschiedlichen Verdünnungen

- — — — — — Seminalplasma Nr. 1
- ▲ — — — — — Seminalplasma Nr. 2
- ◇ — — — — — Seminalplasma Nr. 3
- — — — — — Seminalplasma Nr. 4

3.3.2. Reproduzierbarkeit

Die ACE-Aktivität eines Seminalplasmas, das 1:11 verdünnt war, wurde in 19 Testansätzen bestimmt. Es ergaben sich die in Abbildung 12 und Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse.

Statistik:

Das arithmetische Mittel der 19 Testansätze lag bei $1,90 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 0,155$ und einer Varianz $s^2 = 0,024$. Die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) betrug $0,036$ und der Variationskoeffizient hatte den Wert $8,15 \%$. Damit ist die Reproduzierbarkeit des Tests zur Bestimmung der ACE-Aktivität mit Hip-L-His-L-Leu erfüllt.

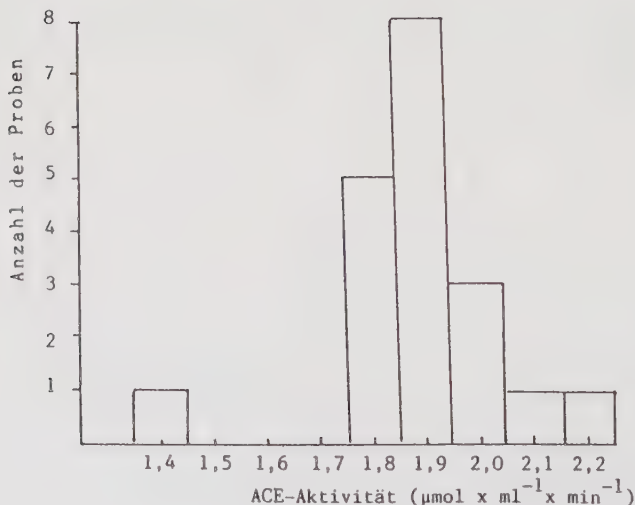


Abb. 12 Reproduzierbarkeit - Die ACE-Aktivität eines Seminalplasmas (1:11 verdünnt) wurde 19 mal gemessen.

Messung Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extinktion bei 228 nm	0,3325	0,2925	0,3125	0,2975	0,3125	0,3175	0,2875	0,3225	0,3325	0,3125
Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1}$ $\times \text{min}^{-1}$)	2,19	1,8	1,925	1,83	1,925	1,96	1,77	1,99	2,05	1,925
Messung Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Extinktion bei 228 nm	0,2325	0,3125	0,2925	0,3125	0,3425	0,2975	0,3125	0,3125	0,3125	
Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1}$ $\times \text{min}^{-1}$)	1,43	1,925	1,8	1,925	2,11	1,83	1,925	1,925	1,925	

Tab. 1 Reproduzierbarkeit - Die Aktivität eines 1:11 verdünnten Seminalplasmas wurde 19 mal gemessen

3.3.3. Interassay-Genauigkeit

Zum Nachweis der Interassay-Genauigkeit wurden 10 Seminalplasmaproben, die mit Puffer 1:11 verdünnt waren, nach vier Monaten erneut gemessen. Es ergaben sich die in Tabelle 2 und Abbildung 13 aufgezeigten Ergebnisse. Anhand der Abweichungen ist zu erkennen, daß die Interassay-Genauigkeit bei der Bestimmung der ACE-Aktivität mit Hip-L-His-L-Leu gegeben ist und das Angiotensin-Converting-Enzyme bei - 20°C nicht gefrierempfindlich ist.

Seminalplasma Nr.	ACE-Aktivität zu Beginn (U x ml ⁻¹)	ACE-Aktivität nach 4 Monaten (U x ml ⁻¹)	Differenz der Aktivitäten (%)
1	1,97	2,22	12,6/11,3
2	1,60	1,72	7,5/ 7,0
3	2,46	2,46	0
4	2,71	2,71	0
5	2,71	2,97	9,6/ 8,8
6	2,03	2,11	3,9/ 3,8
7	2,19	2,35	7,3/ 6,8
8	2,03	2,09	3,0/ 2,9
9	3,08	2,96	3,9/ 4,1
10	2,53	2,46	2,8/ 2,8

Tab. 2 Interassay-Genauigkeit - Die ACE-Aktivitäten von 10 verdünnten Seminalplasmen (1:11) wurden nach vier Monaten erneut gemessen.

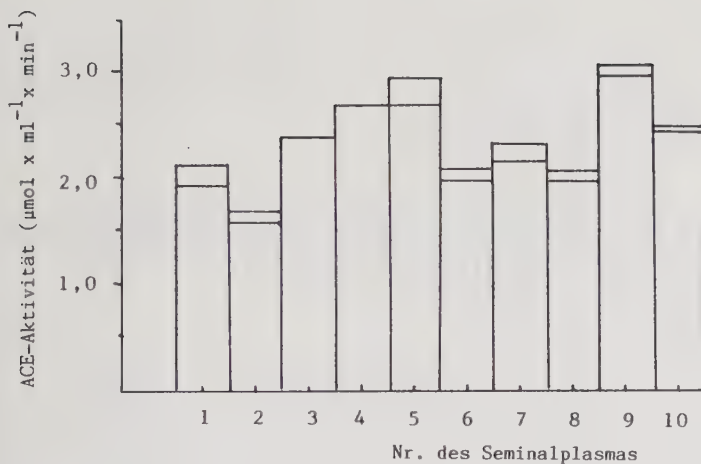


Abb. 13 Interassay-Genauigkeit - Die ACE-Aktivität von 10 Seminalplasmen (1:11 verdünnt) wurde nach vier Monaten erneut gemessen. Die einzelnen Balken zeigen die gemessenen ACE-Aktivitäten vor und nach vier Monaten.

3.4. Eigenschaften des Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma

3.4.1. Temperaturabhängigkeit

In diesem Versuch wurde die ACE-Aktivität eines Seminalplasmas bei 22°C und 37°C bestimmt.

Für alle Verdünnungen des Seminalplasmas (1:3, 1:5, 1:11, 1:21) war die ACE-Aktivität bei 37°C höher als bei 22°C. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

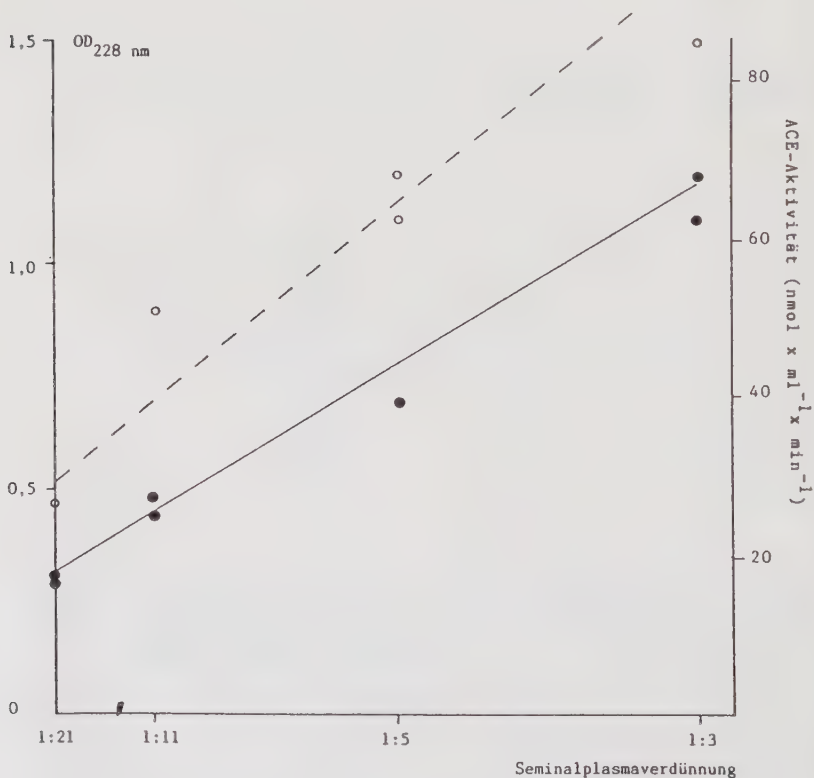


Abb. 14 Temperaturabhängigkeit - Die ACE-Aktivität der verschiedenen Verdünnungen eines Seminalplasmas wurde bei 22°C (●—●) und 37°C (○—○) gemessen.

3.4.2. Bestimmung der optimalen Substratkonzentration

In diesem Versuch wurde der Einfluß verschiedener Substratkonzentrationen auf die ACE-Aktivität untersucht. Es wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Ergebnisse gefunden. ¹

Substratkonzentration (mM)	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität (Reak- tionsgeschwindigkeit v) ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)
0,15	0,07	0,20
0,25	0,12	0,33
0,5	0,21	0,59
1,0	0,36	1,00
1,25	0,44	1,23
2,5	0,73	2,04
5,0	0,96	2,70
7,0	0,87	2,44
10,0	0,87	2,44
15,0	0,85	2,38

Tab. 3 ACE-Aktivität im Seminalplasma (1:5 verdünnt) bei verschiedener Substratkonzentration (HHL)

Mit zunehmender Substratkonzentration von Hip-L-His-L-Leu bis 5,0 mM zeigte sich ein Anstieg der ACE-Aktivität. Bei größeren Konzentrationen als 5,0 mM nahm die ACE-Aktivität wieder ab, was auf eine Substrathemmung in diesem Bereich hindeutet (Abb. 15).

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die Michaeliskonstante K_m können aus dem Lineweaver-Burk-Dia-

gramm (43) (Abb. 16) abgeleitet werden bzw. mit der Formel

$$- \frac{1}{v} = - \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{berechnet werden.}$$

Die graphische Bestimmung aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 16) ergab für das ACE des in diesem Versuch eingesetzten Seminalplasmas eine $V_{max} = 3,7 \mu\text{M}/\text{min}$ und eine $K_m = 2,50 \text{ mM}$.

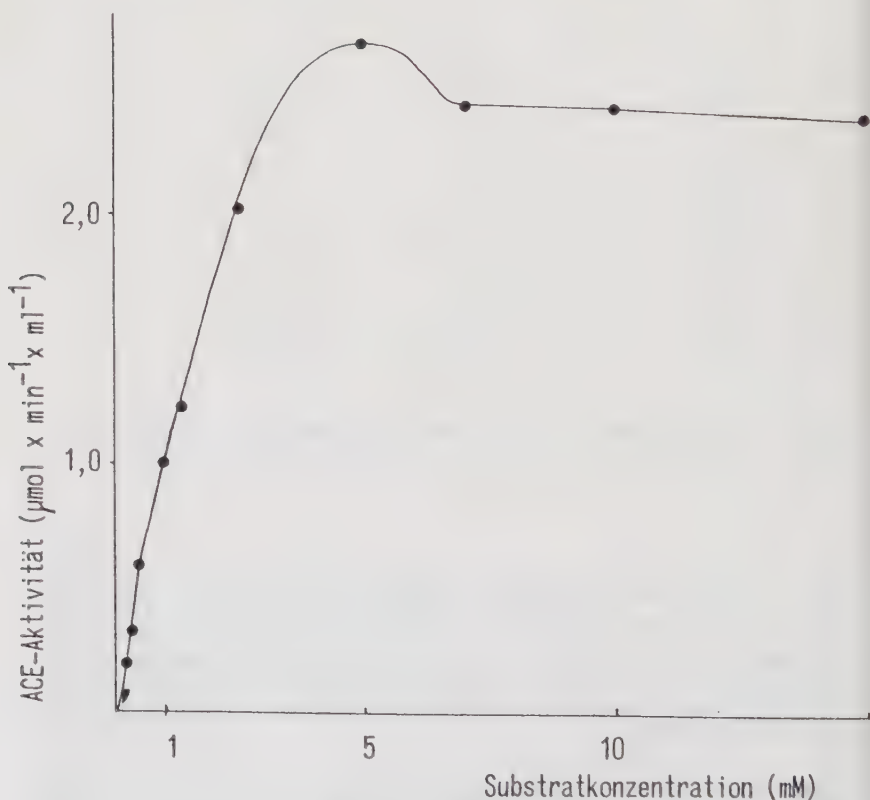


Abb. 15 Einfluß der Substratkonzentration (Hip-L-His-L-Leu) auf die ACE-Aktivität im humanen Seminalplasma

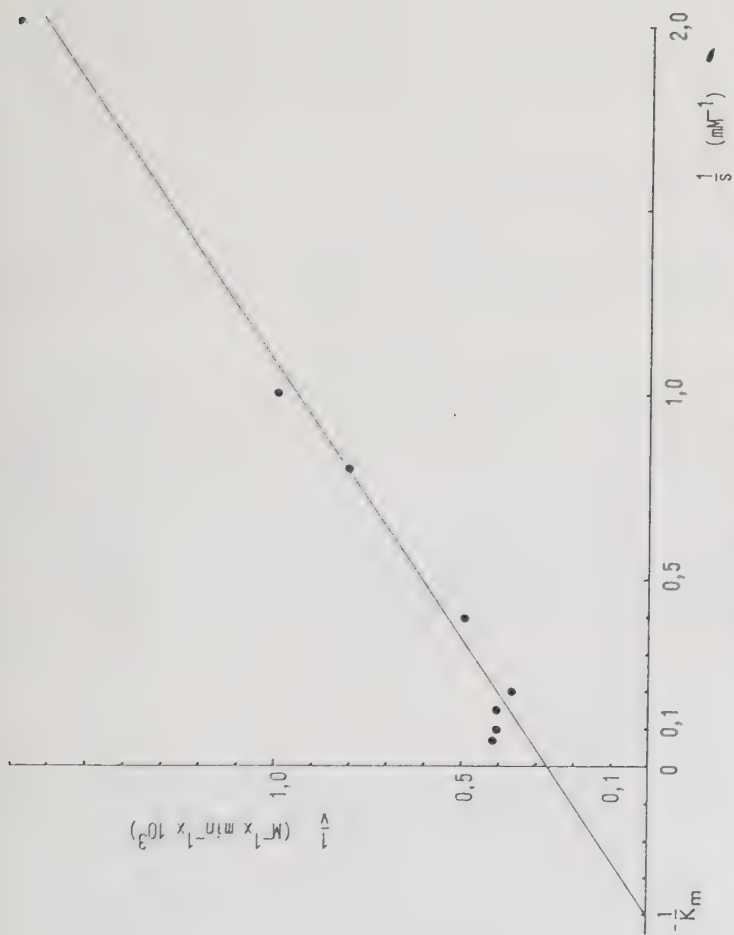


Abb. 16 Lineweaver-Burk-Diagramm - Bestimmung der K_m des ACE im humanen Seminalplasma mit dem Substrat s (Hip-L-His-L-Leu)

3.4.3. Hemmung der ACE-Aktivität mit Gossypol acetic acid

Gossypol acetic acid hat bei Männern nach oraler Applikation eine infertile Wirkung, die nach Absetzen dieser Substanz reversibel ist (vgl. 2.1.4.3.). Deshalb wurde geprüft, ob Gossypol acetic acid die ACE-Aktivität hemmen kann (52).

3.4.3.1. DMSO als Lösungsvermittler

Die ersten Versuche wurden mit DMSO als Lösungsvermittler durchgeführt. Sie zeigten, daß sowohl Gossypol acetic acid als auch DMSO die ACE-Aktivität hemmen.

Die Wirkung des reinen Lösungsmittelgemisches DMSO/Puffer (Puffersystem II) ohne Gossypol acetic acid ist in Abbildung 17 dargestellt. Im Versuch konnte die Hemmung mit DMSO nur bis zu einem Gehalt von 4,0 Vol.% getestet werden, da die zugegebene DMSO-Menge sonst größer als 10 µl gewesen wäre (s. 2.1.4.3.1.) und die Versuchsbedingungen (Molaritäten) nicht mehr eingehalten hätten werden können. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

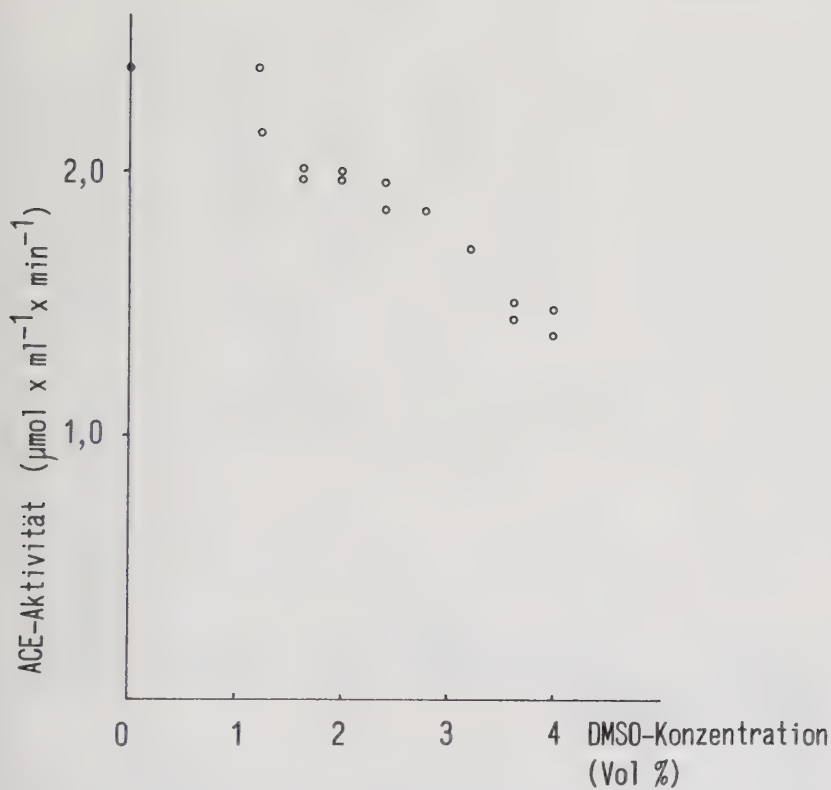


Abb. 17 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas mit DMSO

DMSO-Konzentration (Vol. %)	Extinktion bei 228 nm		ACE-Aktivität (U x ml ⁻¹)		Hemmung (%)	
0	0,86		2,41		0	
1,2	0,86	0,76	2,41	2,13	0	11,6
1,6	0,76	0,71	2,13	1,99	11,6	17,4
2,0	0,73	0,71	2,04	1,99	15,4	17,4
2,4	0,66	0,70	1,85	1,96	23,2	18,7
2,8	0,66		1,85		23,2	
3,2	0,61		1,71		29,0	
3,6	0,51	0,54	1,43	1,51	40,7	37,3
4,0	0,53	0,49	1,48	1,37	38,6	43,2

Tab. 4 Hemmung der ACE-Aktivität des humanen Seminalplasmas (1:5 verdünnt) mit DMSO

3.4.3.2. N,N-Dimethylformamid (DMF) als Lösungsvermittler

Da DMSO die Aktivität von ACE hemmt, wurde N,N-Dimethylformamid als Lösungsvermittler gewählt, denn es zeigte keine Hemmwirkung.

Die Hemmung der ACE-Aktivität mit Gossypol acetic acid war konzentrationsabhängig (Abb. 18). Die Abbildungen 18 und 19 zeigen, daß die Abnahme der ACE-Aktivität am größten war, wenn die Gossypol acetic acid Konzentration im Bereich von 0 bis 0,1 mM lag. Eine Konzentration von 0,1 mM hemmte die ACE-Aktivität zu 50 %. Eine vollständige Hemmung der ACE-Aktivität wurde ab einer Konzentration von 0,6 mM beobachtet.

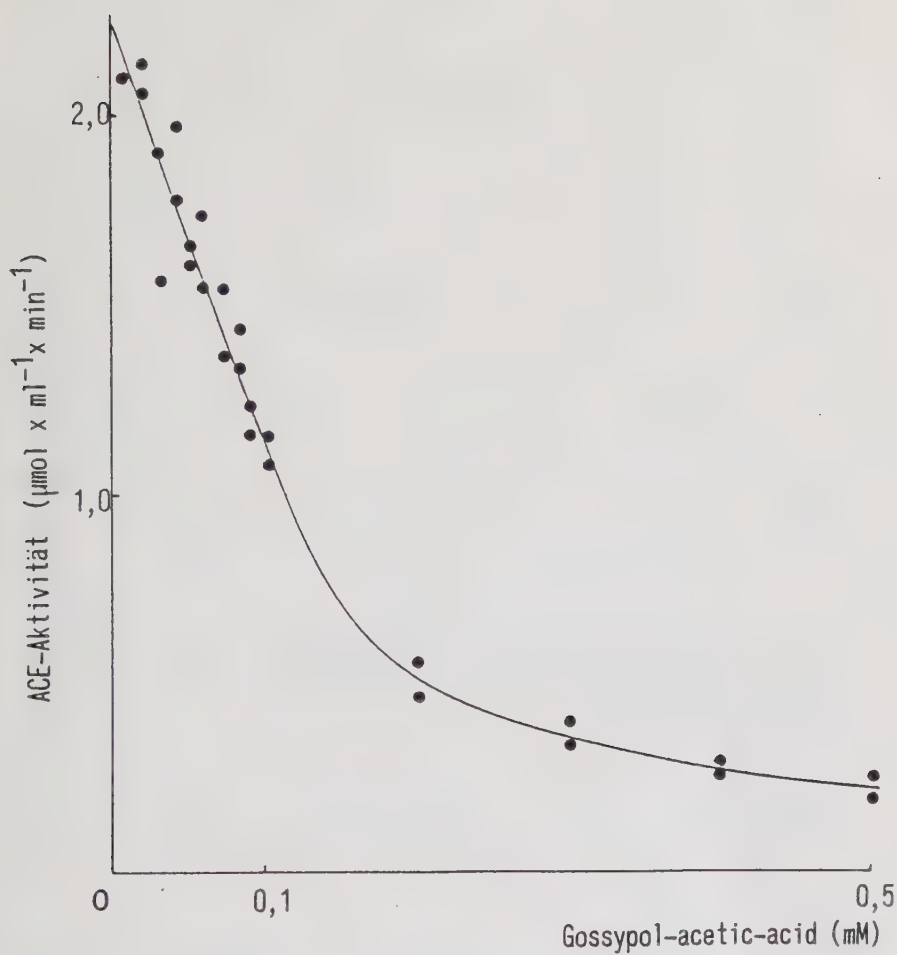


Abb. 18 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas
(1:5 verdünnt) mit Gossypol-acetic-acid

In Abbildung 20 ist der Dixon-Plot für die Hemmung der ACE-Aktivität mit Gossypol acetic acid dargestellt (73). Unter einem Dixon-Plot versteht man die graphische Darstellung mit den Funktionspaaren (I ; v^{-1}) als Abszisse bzw. Ordinate, wobei I für die Hemmstoffkonzentration und v für die umgesetzte Substratmenge pro Zeit steht. Da bei einer Substratkonzentration von 5 mM das ACE im Testansatz mit Substrat gesättigt war, kann man aus dem Dixon-Plot (Abb. 20) eine $K_i = 0,07 \times 10^{-3} \text{ M}$ im Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate und eine $V_{\max} = 2,95 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ im Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ermitteln. Dieses $V_{\max}$ unterscheidet sich vom $V_{\max}$ aus Abbildung 16, da durch Hemmstoffe der Enzymcharakter verändert werden kann. Nur bei der kompetitiven Hemmung ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unverändert, da das aktive Zentrum vom Hemmstoff reversibel besetzt wird und dieser durch Erhöhung der Substratkonzentration verdrängt wird. Dieser Hemmtyp kann hier ausgeschlossen werden, da die Gerade im Dixon-Plot (Abb. 20) bei Substratsättigung, die im Versuch vorlag, nicht zur Abszisse parallel verläuft (73). Bei den anderen Hemmtypen wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit durch den Inhibitor kleiner, da das aktive Zentrum irreversibel besetzt wird oder die Struktur des Enzyms verändert wird.

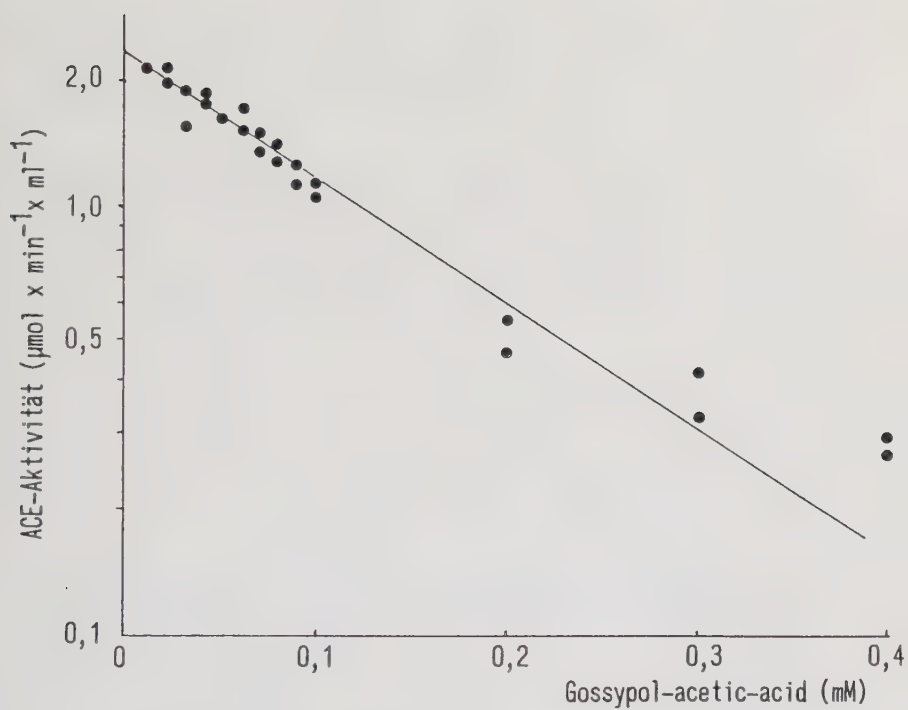


Abb. 19 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas (1:5 verdünnt) mit Gossypol acetic acid in halblogarithmischer Darstellung

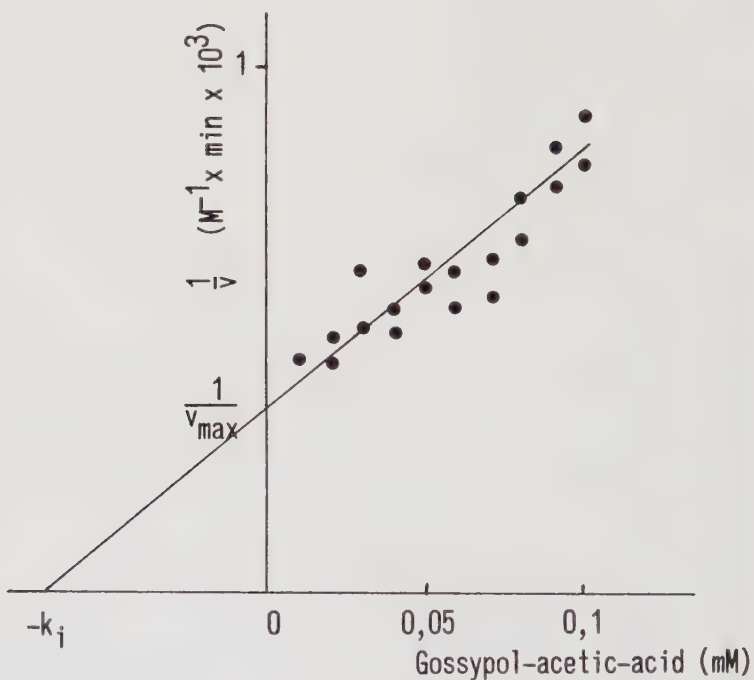


Abb. 20 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas mit Gossypol-acetic-acid - Bestimmung der Inhibitor-konstante K_i (Dixon-Plot-Darstellung)

3.4.4. Hemmung der ACE-Aktivität mit Captopril

Da Captopril als spezifischer Inhibitor des ACE angesehen wird (49), wurde seine Hemmwirkung auf die Aktivität des ACE im humanen Seminalplasma untersucht (52).

Es wurde gefunden, daß die Hemmung der ACE-Aktivität von der Captopril-Konzentration abhängig war. Bei einer Konzentration von 240 nM wurde die ACE-Aktivität über 95 % gehemmt. Abbildung 21 zeigt in halblogarithmischer Darstellung die Abhängigkeit der Aktivität von ACE von der Captopril-Konzentration.

Für das in dieser Versuchsreihe verwendete Captopril ergeben sich aus dem Dixon-Plot (Abb. 22) (Beschreibung s. 3.4.3.2.) eine $K_i = 5$ nM und eine $V_{max} = 3,17 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für das ACE im humanen Seminalplasma. Auch hier unterscheidet sich die maximale Umsatzgeschwindigkeit von den unter anderen Bedingungen ermittelten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten, da das Enzym durch den Inhibitor verändert worden sein konnte. Da die Gerade bei Substratsättigung im Dixon-Plot nicht parallel zur Abszisse ist, kann eine kompetitive Hemmung der ACE-Aktivität durch Captopril ausgeschlossen werden.

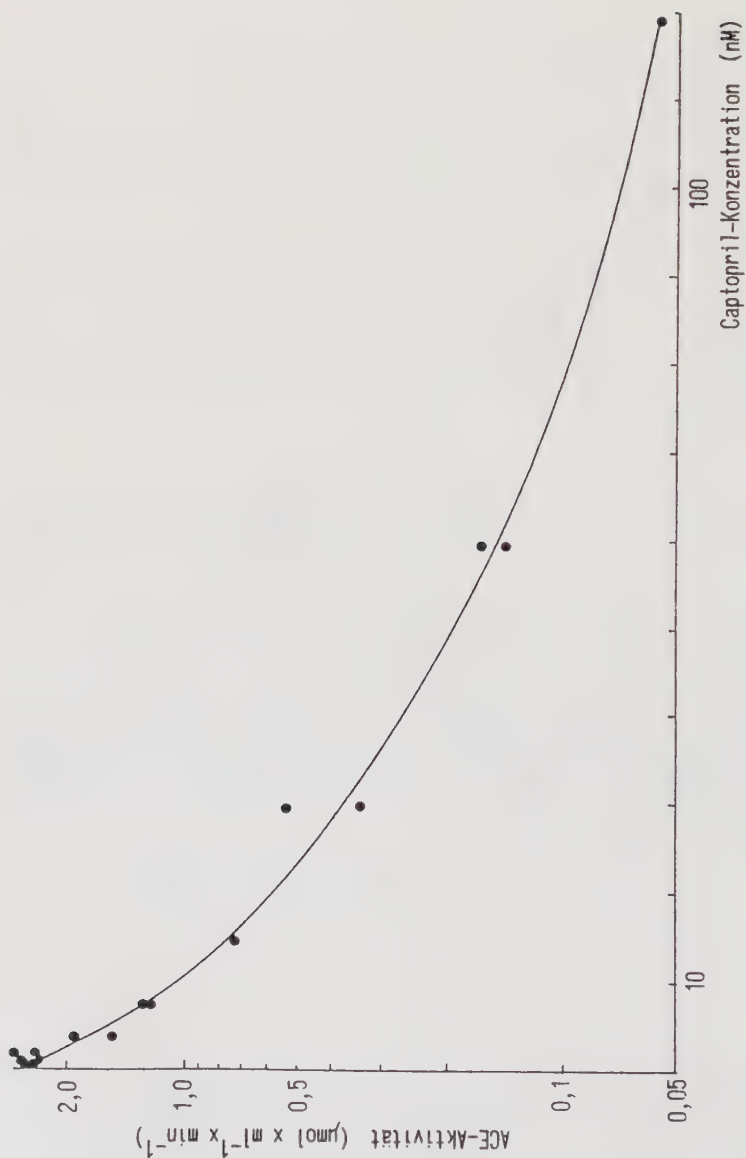


Abb. 21 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas (1:5 verdünnt) mit Captopril in halblogarithmischer Darstellung

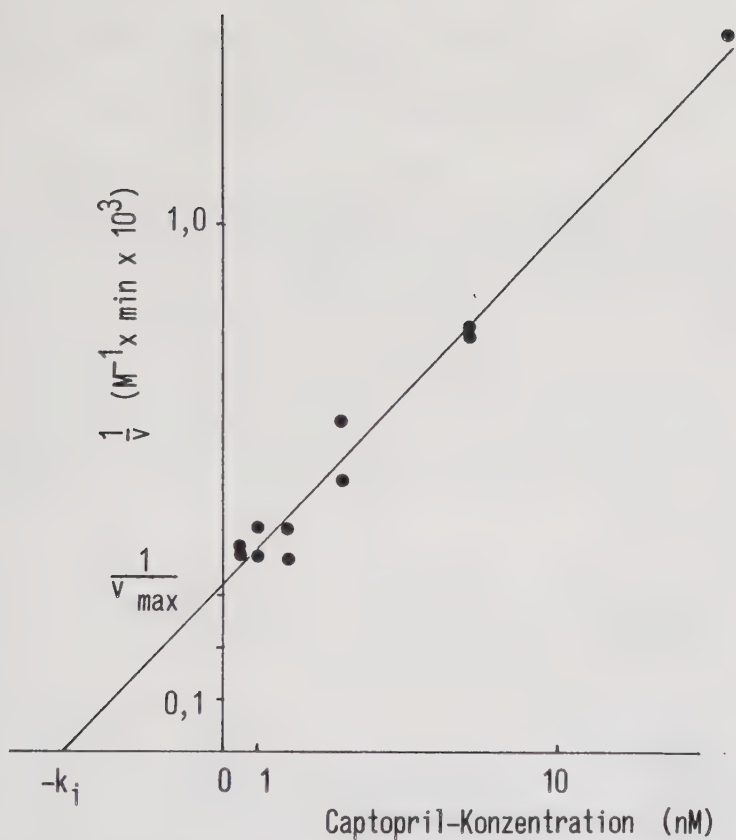


Abb. 22 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas mit Captopril - Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i (Dixon-Plot-Darstellung)

3.4.5. Hemmung der ACE-Aktivität mit EDTA

In dieser Versuchsreihe wurde EDTA als Inhibitor eingesetzt, da ACE das Kation von Zink äquimolar enthält und somit zur Gruppe der Metalloproteine gehört. Die Enzymaktivität kann durch die Chelatbildung von EDTA mit Zink gehemmt werden.

Die Abbildung 23 zeigt, wie sich die ACE-Aktivität bei verschiedenen EDTA-Konzentrationen verhält. Bei einer Konzentration von 100 μM wurde die Aktivität von ACE über 90 % gehemmt.

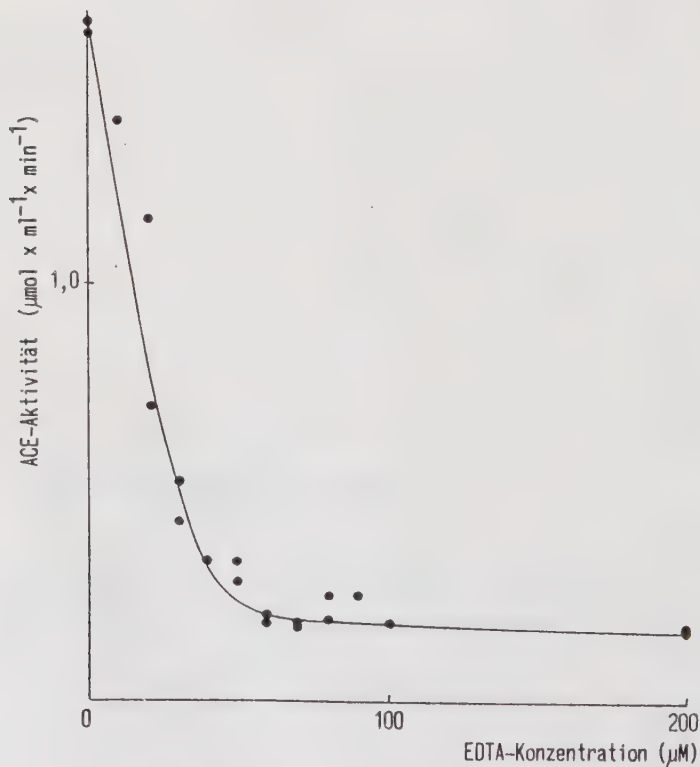


Abb. 23 Hemmung der ACE-Aktivität eines Seminalplasmas (1:5 verdünnt) mit EDTA

3.5. Verteilung von Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma

3.5.1. Untersuchungen von Membranvesikelfraktionen

3.5.1.1. Isolierung der Membranvesikelfraktion

Seminalplasma wurde über eine Sephadex G 200 Säule (2,0 x 57,0 cm) mit dem Eluationspuffer nach Stegmayr (Tris-HCl-Puffer: 0,05 M, pH 7,32, 138 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) chromatographiert. Abbildung 24 zeigt das Eluationsdiagramm. Der erste Peak enthält die Membranvesikel, die von einigen Autoren (82) auch als Prostatasomen bezeichnet werden, um auf ihren Ursprung aus der Prostata hinzuweisen. In der Abbildung 25 ist die Chromatographie dieser aus dem Seminalplasma stammenden Membranvesikel nach Sedimentation in der präparativen Ultrazentrifuge (14 h, 38.000 x g, 2°) dargestellt.

3.5.1.2. Bestimmung der ACE-Aktivität in der Membranvesikelfraktion

In den einzelnen Fraktionen, die durch die Chromatographie (s. 2.1.5.1.2.) gewonnen worden waren, wurde die ACE-Aktivität ermittelt (47). Die höchsten Aktivitäten waren im Bereich des ersten Peaks nachzuweisen (Abb. 26)(41). In Gegenwart von 100 mM EDTA konnte die ACE-Aktivität vollständig gehemmt werden.

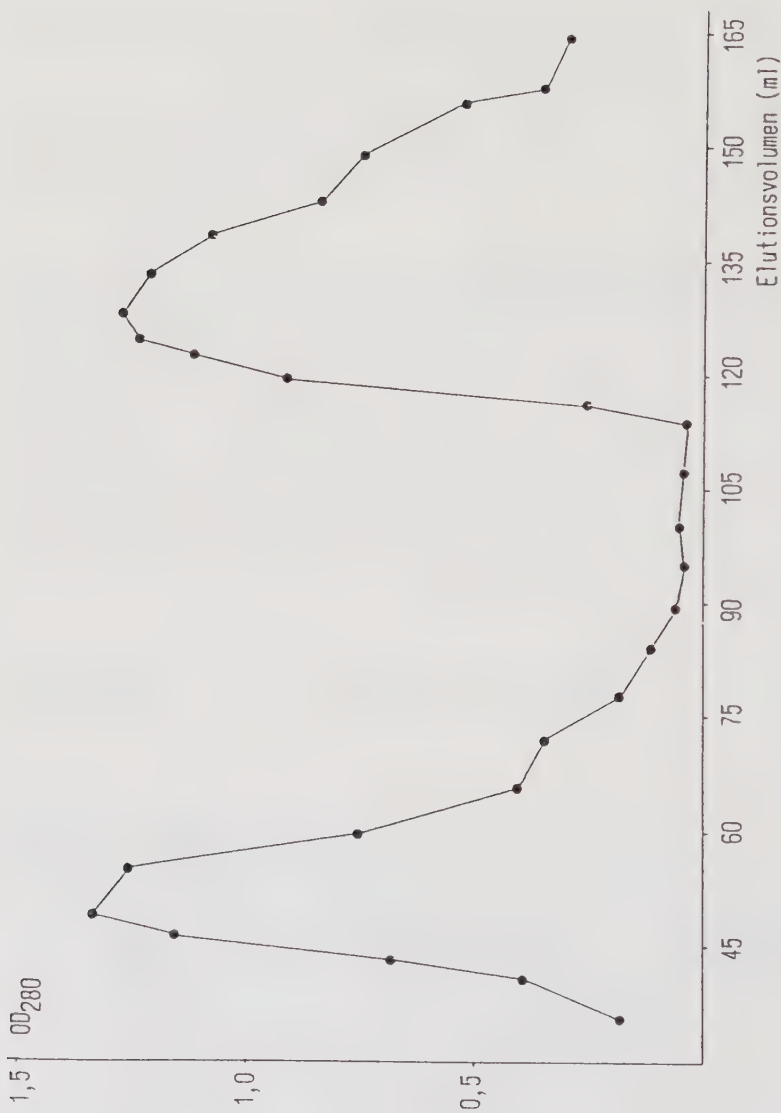


Abb. 24 Chromatographie von humanen Seminalplasma (Sephadex G 200: 2,0 x 57,0 cm)

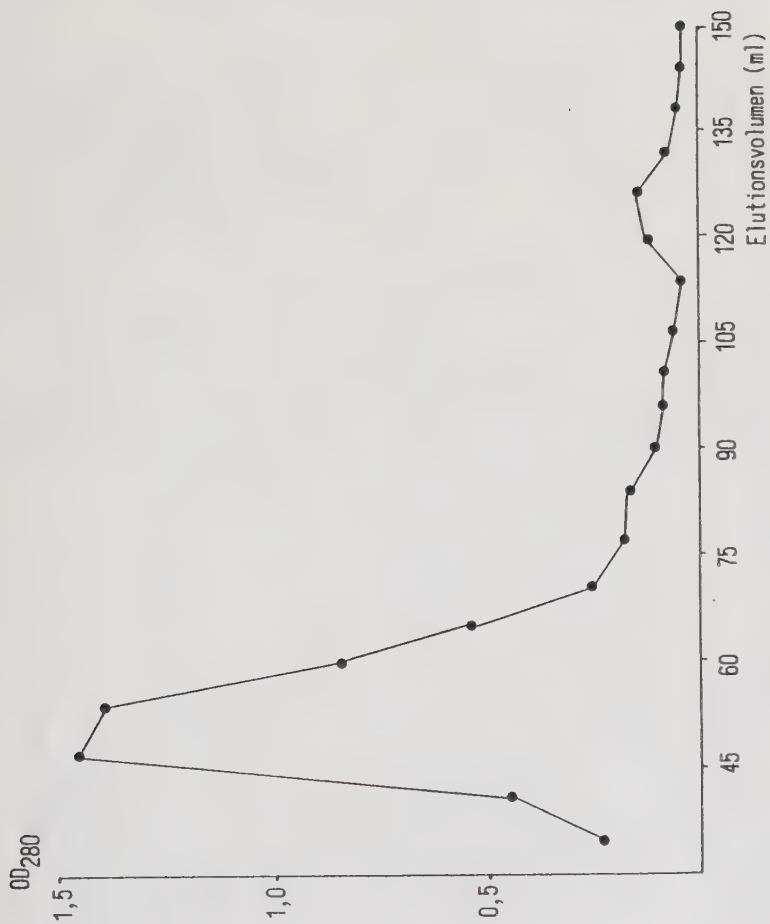


Abb. 25 Chromatographie der Membranvesikel des humanen Seminalplasmas nach Sedimentation in der Ultrazentrifuge (Sephadex G 200: 2,0 x 57,0 cm)

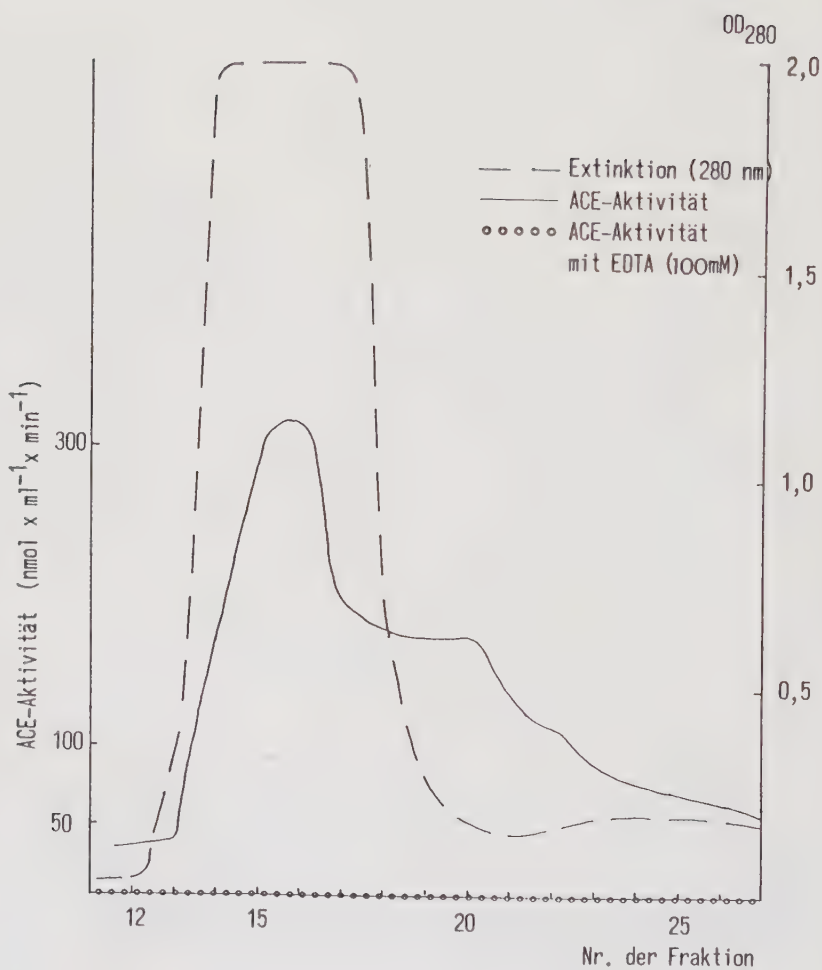


Abb. 26 Verteilung der ACE-Aktivität der Membranvesikel-fraktion im humanen Seminalplasma

3.5.2. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit Normozoospermie

In diesem Versuch wurden 40 Ejakulate von Patienten der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Universitätsklinik München mit Normozoospermie auf ihre ACE-Aktivität untersucht. Dabei ergaben sich die in Tabelle 5 und Abbildung 27 aufgestellten Ergebnisse.

Für diese $n = 40$ Patienten betrug das arithmetische Mittel $\bar{x}$ der ACE-Aktivitäten $1,98 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 0,521$ und einer Varianz $s^2 = 0,271$. Die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) hatte den Wert $0,082$. Der 95 % - Vertrauensbereich des wahren Mittelwertes ($\bar{m} \pm 2 \cdot s_{n-1}$) lag zwischen $1,82$ und $2,14 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Der Variationskoeffizient V_k betrug $26,3 \%$.

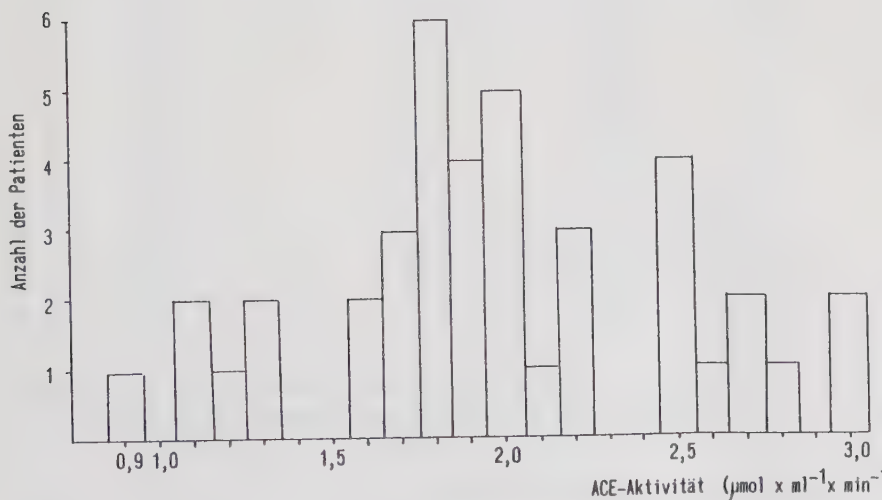


Abb. 27 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von 40 Patienten mit Normozoospermie

Patient Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	Abweichung vom Mittelwert $\bar{x}$
1	0,285	1,76	- 0,22
2	0,285	1,76	- 0,22
3	0,215	1,32	- 0,66
4	0,275	1,69	- 0,29
5	0,18	1,11	- 0,87
6	0,18	1,11	- 0,87
7	0,325	2,0	+ 0,02
8	0,295	1,82	- 0,16
9	0,325	2,0	+ 0,02
10	0,31	1,91	- 0,07
11	0,292	1,80	- 0,18
12	0,31	1,91	- 0,07
13	0,21	1,29	- 0,69
14	0,145	0,89	- 1,09
15	0,28	1,72	- 0,26
16	0,295	1,82	- 0,16
17	0,255	1,57	- 0,41
18	0,44	2,71	+ 0,73
19	0,355	2,19	+ 0,21
20	0,41	2,53	+ 0,55
21	0,35	2,16	+ 0,18
22	0,50	3,08	+ 1,10
23	0,44	2,71	+ 0,73
24	0,33	2,03	+ 0,05
25	0,33	2,03	+ 0,05
26	0,45	2,50	+ 0,52
27	0,40	2,46	+ 0,48
28	0,36	2,22	+ 0,24
29	0,31	1,91	- 0,07
30	0,43	2,65	+ 0,67
31	0,26	1,60	- 0,38
32	0,485	2,99	+ 1,01
33	0,29	1,77	- 0,21
34	0,40	2,46	+ 0,48
35	0,36	2,22	+ 0,24
36	0,29	1,77	- 0,21
37	0,455	2,80	+ 0,82
38	0,20	1,23	- 0,75
39	0,30	1,85	- 0,13
40	0,32	1,97	- 0,01

Tab. 5 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von 40 Patienten mit Normozoospermie - Mittelwert $\bar{x}$ betrug $1,98 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

3.5.3. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit Klinefelter Syndrom

In dieser Versuchsreihe wurde die ACE-Aktivität in den Ejakulaten von zwölf Patienten mit Klinefelter Syndrom bestimmt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 6 und Abbildung 28 aufgezeigten Ergebnisse.

Das arithmetische Mittel $\bar{x}$ der ACE-Aktivitäten in den Seminalplasmen der zwölf Patienten hatte den Wert $2,21 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 0,809$ und einer Varianz $s^2 = 0,655$. Die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) betrug $0,234$ und der Variationskoeffizient lag bei $36,6 \%$. Nach dem F-Test ($p < 1 \%$) waren die Varianzen der ACE-Aktivitäten in den Seminalplasmen der Patienten mit Klinefelter Syndrom und in den Seminalplasmen der Patienten mit Normozoospermie signifikant verschieden. Deshalb wurde der U-Test zum Vergleich der beiden Mittelwerte durchgeführt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $28,22 \%$.

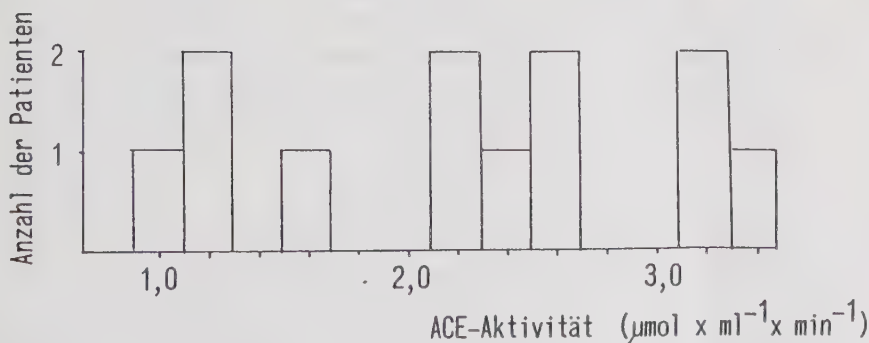


Abb. 28 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von 12 Patienten mit Klinefelter-Syndrom

Patient Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	Abweichung vom Mittelwert $\bar{x}$
1	0,19	1,17	- 1,04
2	0,15	0,92	- 1,29
3	0,505	3,11	+ 0,90
4	0,21	1,29	- 0,92
5	0,54	3,33	+ 1,12
6	0,425	2,62	+ 0,41
7	0,41	2,53	+ 0,32
8	0,345	2,13	- 0,08
9	0,51	3,14	+ 0,93
10	0,365	2,25	+ 0,04
11	0,26	1,60	- 0,61
12	0,39	2,40	+ 0,19

Tab. 6 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von 12 Patienten mit Klinefelter-Syndrom - Der Mittelwert $\bar{x}$ betrug $2,21 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

3.5.4. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen

In dieser Versuchsreihe wurde die ACE-Aktivität in Seminalplasma-proben von 70 Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen bestimmt. Die einzelnen Meßergebnisse sind in Tabelle 7 und Abbildung 29 dargestellt.

Das arithmetische Mittel $\bar{x}$ der ACE-Aktivitäten der 70 Proben hatte den Wert $1,69 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 0,828$ und einer Varianz $s^2 = 0,685$. Die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) betrug $0,099$ und der Variationskoeffizient lag bei 49% . Nach dem F-Test ($p < 1 \%$) war die Varianz der ACE-Aktivitäten dieser 70 Proben signifikant von der Varianz der ACE-Aktivitäten in den Seminalplasmen der Patienten mit Normozoospermie verschieden. Deshalb wurde hier der U-Test zum Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der beiden Kollektive bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $0,02 \%$. Der Mittelwert der ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist geringer als der Mittelwert der ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie.

Patient Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	Abweichung vom Mittelwert $\bar{x}$
1	0,035	0,22	- 1,47
2	0,06	0,37	- 1,32
3	0,07	0,43	- 1,26
4	0,07	0,43	- 1,26
5	0,08	0,49	- 1,20
6	0,08	0,49	- 1,20
7	0,12	0,74	- 0,95
8	0,13	0,80	- 0,89
9	0,15	0,92	- 0,77
10	0,15	0,92	- 0,77
11	0,15	0,92	- 0,77
12	0,15	0,92	- 0,77
13	0,16	0,99	- 0,70
14	0,17	1,05	- 0,64
15	0,17	1,05	- 0,64
16	0,17	1,05	- 0,64
17	0,17	1,05	- 0,64
18	0,18	1,11	- 0,58
19	0,18	1,11	- 0,58
20	0,18	1,11	- 0,58
21	0,18	1,11	- 0,58
22	0,18	1,11	- 0,58
23	0,19	1,17	- 0,52
24	0,19	1,17	- 0,52
25	0,20	1,23	- 0,46
26	0,21	1,29	- 0,40
27	0,21	1,29	- 0,40
28	0,22	1,36	- 0,33
29	0,22	1,36	- 0,33
30	0,225	1,39	- 0,30
31	0,23	1,42	- 0,27
32	0,235	1,45	- 0,24
33	0,24	1,48	- 0,21
34	0,24	1,48	- 0,21
35	0,245	1,51	- 0,18
36	0,25	1,54	- 0,15
37	0,26	1,60	- 0,09
38	0,26	1,60	- 0,09
39	0,26	1,60	- 0,09
40	0,27	1,66	- 0,03
41	0,275	1,70	+ 0,01
42	0,28	1,73	+ 0,04
43	0,29	1,79	+ 0,10
44	0,29	1,79	+ 0,10
45	0,29	1,79	+ 0,10

Patient Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	Abweichung vom Mittelwert $\bar{x}$
46	0,295	1,82	+ 0,13
47	0,30	1,85	+ 0,16
48	0,31	1,91	+ 0,22
49	0,31	1,91	+ 0,22
50	0,315	1,94	+ 0,25
51	0,355	2,19	+ 0,50
52	0,36	2,22	+ 0,53
53	0,39	2,40	+ 0,71
54	0,39	2,40	+ 0,71
55	0,40	2,46	+ 0,77
56	0,40	2,46	+ 0,77
57	0,415	2,56	+ 0,87
58	0,415	2,56	+ 0,87
59	0,42	2,59	+ 0,90
60	0,45	2,77	+ 1,08
61	0,46	2,83	+ 1,14
62	0,46	2,83	+ 1,14
63	0,46	2,83	+ 1,14
64	0,49	2,96	+ 1,27
65	0,495	3,05	+ 1,36
66	0,50	3,08	+ 1,39
67	0,53	3,26	+ 1,57
68	0,53	3,26	+ 1,57
69	0,57	3,51	+ 1,82
70	0,59	3,63	+ 1,94

Tab. 7 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von 70 Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Der Mittelwert $\bar{x}$ betrug $1,69 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

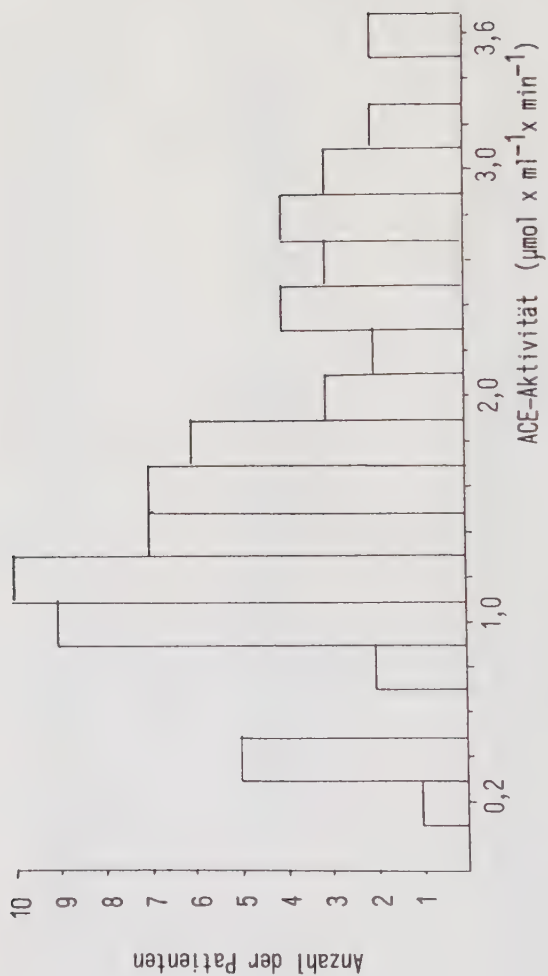


Abb. 29 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von 70 Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen.

3.5.5. Bestimmung der ACE-Aktivität in Split-Ejakulaten

In dieser Versuchsreihe wurden die ACE-Aktivitäten von 19 Split-Ejakulaten, die jeweils in zwei Fraktionen gewonnen worden waren, gemessen. Die ACE-Aktivitäten dieser 19 Split-Ejakulate sind in Tabelle 8 und Abbildung 30 aufgezichnet.

Der Vergleich der ACE-Aktivitäten in den beiden Fraktionen (I, II) ergab bei 14 Patienten eine höhere ACE-Aktivität in Fraktion I, das vermehrt Prostatasekretanteile aufweist. Bei fünf Ejakulaten konnte aus der Verteilung der übrigen Parameter geschlossen werden, daß die Gewinnung der beiden Fraktionen nicht den Erwartungen entsprechend erfolgt war.

Statistisch ergab sich für die Fraktion I ein arithmetisches Mittel $\bar{x} = 2,49 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ mit einer Standardabweichung $s_{n-1} = 0,902$ und einer Varianz $s^2 = 0,814$. Die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) betrug 0,207 und der Variationskoeffizient hatte den Wert 36,22 %. Das arithmetische Mittel der ACE-Aktivitäten der Fraktion II betrug $1,64 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 0,789$ und einer Varianz $s^2 = 0,622$. Die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) belief sich auf 0,181 und der Variationskoeffizient hatte den Wert 48,1 %. Nach dem gepaarten T-Test waren die beiden Mittelwerte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant verschieden. Man kann damit sagen, daß in Fraktion I die ACE-Aktivität signifikant höher war als in Fraktion II.

Ejakulat Nr.	ACE-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)		
	Fraktion I	Fraktion II	Differenz der ACE-Aktivitäten der beiden Fraktionen
1	1,60	3,33	- 1,73
2	2,71	1,63	1,08
3	1,05	1,72	- 0,67
4	3,70	1,49	2,21
5	3,08	0,46	2,62
6	1,97	1,51	0,46
7	2,09	1,69	0,40
8	3,88	1,36	2,52
9	3,14	3,45	- 0,31
10	2,06	0,80	1,26
11	3,14	1,85	1,29
12	3,85	1,36	2,49
13	0,89	0,55	0,34
14	2,06	0,99	1,07
15	3,02	2,16	0,86
16	1,88	1,94	- 0,06
17	2,06	2,13	- 0,07
18	1,82	0,95	0,87
19	3,30	1,82	1,48

Tab. 8 ACE-Aktivität in den zwei Fraktionen von 19 Split-Ejakulaten

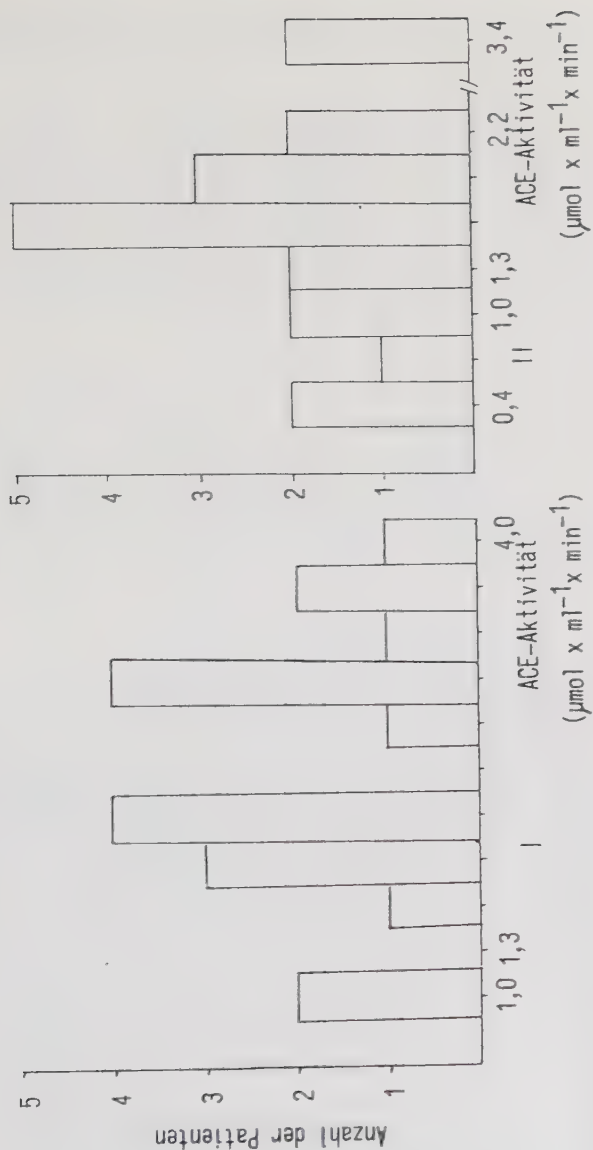


Abb. 30 ACE-Aktivität in den zwei Fraktionen (I, II) von 19 Split-Ejakulaten

3.5.6. Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen von Patienten vor und nach Vasektomie

In diesem Versuch wurde die ACE-Aktivität in den Seminalplasmen von vier Patienten, die sich einer Vasektomie unterzogen hatten, vor und nach dem Eingriff gemessen. Die Tabelle 9 zeigt die gefundenen Ergebnisse.

Es war bei allen Patienten nach der Vasektomie ein Rückgang der ACE-Aktivität feststellbar.

Patient Nr.	Extinktion		ACE-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)		Abnahme der ACE-Aktivität (%)
	vor	nach	vor	nach	
1	0,32	0,08	1,97	0,49	75
2	0,84	0,46	5,17	2,83	45
3	0,29	0,22	1,79	1,36	24
4	0,36	0,23	2,22	1,42	36

Tab. 9 ACE-Aktivität in Seminalplasmen von vier Patienten, die sich einer Vasektomie unterzogen hatten, vor und nach dem Eingriff.

3.6. Bestimmung der ACE-Aktivität im Blutserum

In dieser Versuchsreihe wurde die ACE-Aktivität in Blutserumproben eines weiblichen und eines männlichen Kollektives bestimmt. Um festzustellen, ob noch andere hydrolytische Enzymaktivitäten das Substrat spalteten, wurde etwa jeder siebten Plasmaprobe Captopril in der Konzentration von $28 \mu\text{M}$ zugesetzt und somit die durch Captopril hemmbare ACE-Aktivität bestimmt.

Es zeigte sich eine Restaktivität, die trotz Zugabe von Captopril ($28 \mu\text{M}$ im Testansatz) noch nachweisbar war. Sie war auf unspezifische hydrolytische Enzymaktivitäten zurückzuführen, die im verdünnten Seminalplasma mit $2,5 \%$ n-Butanol vollständig gehemmt werden konnten, aber im unverdünnten Serum noch vorhanden waren. Die Hemmung betrug bei den Frauen $63,6 \pm 5,92 \%$ und bei den Männern $73,96 \pm 4,98$.

Ein Serum aus dieser Versuchsreihe stammte von einer Patientin mit Sarkoidoseverdacht. Laut Liebermann (42) ist bei Patienten mit dieser Erkrankung die ACE-Aktivität im Blutserum erhöht. Dies konnte bestätigt werden, da die Patientin im Serum eine ACE-Aktivität von $328,7 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ hatte. Im Vergleich dazu betrug der Mittelwert der ACE-Aktivität in den Serumproben des weiblichen Kollektives $37,7 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und der des männlichen Kollektives $51,4 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Die durch Captopril hemmbare ACE-Aktivität hatte bei den Frauen den Mittelwert $25,2 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und bei den Männern $42,5 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Die einzelnen Ergebnisse sind in den Tabellen 10 bzw. 11 und in Abbildung 31 und 32 dargestellt.

Statistisch ergab sich im Blutserum für das weibliche Kollektiv ($n = 59$) ein arithmetisches Mittel $\bar{x} = 37,7 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ der ACE-Aktivität bei einer Standardabweichung

chung von $s_{n-1} = 24,159$ und einem Variationskoeffizienten von 64,08 %. Das arithmetische Mittel der ACE-Aktivität in den Blutserumproben des männlichen Kollektives ($n = 62$) betrug $51,4 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 27,617$ und einem Variationskoeffizienten von 53,7 %. Die Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) hatten die Werte 3,15 bzw. 3,51. Nach dem F-Test waren die Varianzen nicht signifikant verschieden. Die Mittelwerte der ACE-Aktivität in den Blutseren des männlichen und des weiblichen Kollektives waren nach dem ungepaarten T-Test zu 99 % signifikant verschieden, d.h. bei Männern war die ACE-Aktivität im Blutserum signifikant höher (42).

Der Mittelwert der durch Captopril hemmbaren ACE-Aktivität betrug bei den Frauen ($n = 8$) $25,2 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung von $s_{n-1} = 8,69$ und bei den Männern ($n = 8$) $42,5 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei einer Standardabweichung $s_{n-1} = 16,631$. Die Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) beliefen sich bei den Frauen auf 3,07 und bei den Männern auf 5,88.

Vergleicht man diese Ergebnisse noch mit der mittleren ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie, die in unseren Versuchen $1,98 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ betrug, so stellt man folgendes fest. Die ACE-Aktivität im Seminalplasma war um das 38-fache gegenüber der ACE-Aktivität in Blutseren von Männern bzw. um das 52-fache gegenüber der ACE-Aktivität in den Blutseren von Frauen erhöht.

Patientin Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹)	Extinktion bei 228 nm (Captopril: 28 µM)	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹) durch 28 µM Captopril hemmbar	Hemmung (%)
1	0,085	47,6	0,0375	26,6	55,88
2	0,140	78,4			
3	0,1735	97,2			
4	0,156	87,3			
5	0,060	33,6			
6	0,175	98,0			
7	0,118	66,1			
8	0,065	36,4	0,0425	12,6	34,6
9	0,099	55,4			
10	0,063	35,3			
11	0,042	23,5			
12	0,095	53,2			
13	0,035	19,6			
14	0,096	53,8			
15	0,060	33,6	0,0175	23,8	70,8
16	0,036	20,2			
17	0,084	47,0			
18	0,030	16,8			
19	0,037	20,7			
20	0,015	8,4			
21	0,077	43,1			
22	0,0575	32,2	0,0225	19,6	60,87
23	0,109	61,0			
24	0,033	18,4			
25	0,030	16,8			
26	0,070	39,2			
27	0,085	47,6			
28	0,040	22,4			
29	0,0625	35,0	0,030	18,2	52,0
30	0,091	50,9			
31	0,090	50,4			
32	0,032	17,9			
33	0,040	22,4			
34	0,232	129,9			
35	0,051	28,5			
36	0,060	33,6	0,0075	29,4	87,5
37	0,029	16,2			
38	0,049	27,4			
39	0,090	50,4			
40	0,050	28,0			
41	0,010	5,6			
42	0,046	25,8			

Patientin Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹)	Extinktion bei 228 nm (Captopril: 28 µM)	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹) durch 28 µM Captopril hemmbar	Hemmung (%)
43	0,0825	46,2	0,0275	30,8	66,67
44	0,043	24,0			
45	0,039	21,8			
46	0,036	20,1			
47	0,015	8,4			
48	0,018	10,1			
49	0,040	22,4			
50	0,090	50,4	0,0175	40,6	80,56
51	0,050	28,0			
52	0,013	7,2			
53	0,043	24,0			
54	0,026	14,5			
55	0,096	53,7			
56	0,075	42,0			
57	0,064	35,8			
58	0,063	35,3			
59	0,086	48,2			
Patientin mit Verdacht auf Sarkoidose:					
60	0,587	328,7			

Tab. 10 ACE-Aktivität im Serum von Frauen

Patient Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹)	Extinktion bei 228 nm (Captopril: 28 µM)	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹) durch 28 µM Captopril hemmbar	Hemmung (%)
1	0,110	61,6	0,025	47,6	77,3
2	0,179	100,2			
3	0,066	36,9			
4	0,076	42,6			
5	0,136	76,2			
6	0,104	58,2			
7	0,101	56,5			
8	0,075	42,0	0,015	33,6	80,0
9	0,087	48,7			
10	0,062	34,7			
11	0,044	24,6			
12	0,103	57,7			
13	0,088	49,3			
14	0,063	35,3			
15	0,105	58,8	0,025	44,8	70,2
16	0,095	53,2			
17	0,240	134,4			
18	0,073	40,8			
19	0,173	96,9			
20	0,080	44,8			
21	0,100	56,0			
22	0,0975	54,6	0,0275	39,2	71,8
23	0,123	68,9			
24	0,060	33,6			
25	0,060	33,6			
26	0,060	33,6			
27	0,100	56,0			
28	0,095	53,2			
29	0,065	36,4	0,020	25,2	69,2
30	0,121	67,7			
31	0,113	63,3			
32	0,069	38,6			
33	0,060	33,6			
34	0,030	16,8			
35	0,141	78,9			
36	0,100	56,0	0,55	25,2	45,0
37	0,095	53,2			
38	0,055	30,8			
39	0,027	15,1			
40	0,036	20,2			
41	0,070	39,2			
42	0,050	28,0			

Patient Nr.	Extinktion bei 228 nm	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹)	Extinktion bei 228 nm (Captopril: 28 µM)	ACE-Aktivität (mU x ml ⁻¹) durch 28 µM Captopril hemmbar	Hemmung (%)
43	0,095	53,2	0,010	47,6	89,5
44	0,060	33,6			
45	0,081	45,4			
46	0,060	33,6			
47	0,070	39,2			
48	0,112	62,7			
49	0,131	73,4			
50	0,155	86,8	0,0175	77,0	88,7
51	0,070	39,2			
52	0,175	98,0			
53	0,048	26,9			
54	0,031	17,3			
55	0,306	171,4			
56	0,139	77,8			
57	0,040	22,4			
58	0,095	53,2			
59	0,043	24,1			
60	0,035	21,8			
61	0,059	33,0			
62	0,097	54,3			

Tab. 11 ACE-Aktivität im Serum von Männern

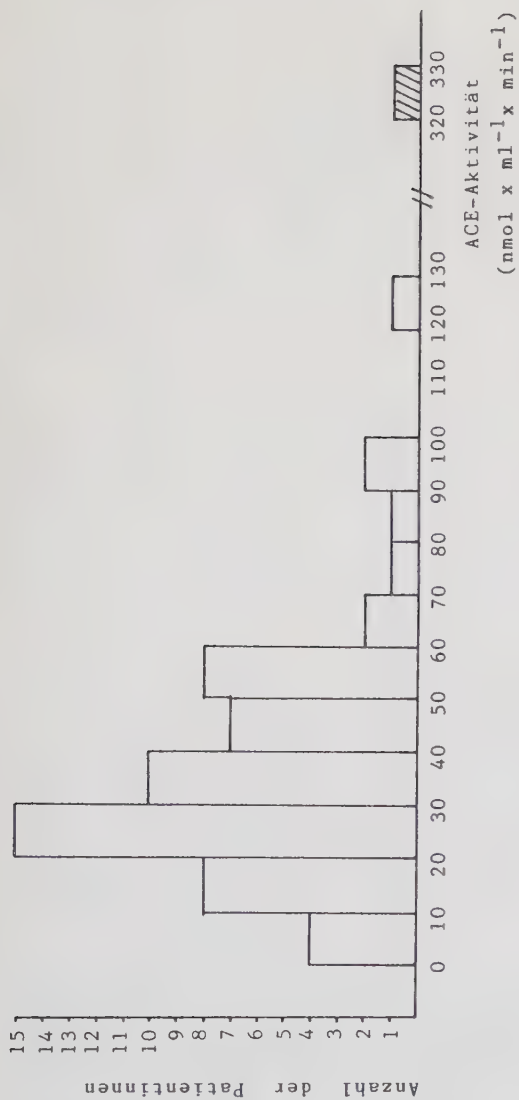


Abb. 31 ACE-Aktivität im Serum von Frauen mit einer Patientin, bei der Verdacht auf Sarkoidose bestand (gestrichelt).

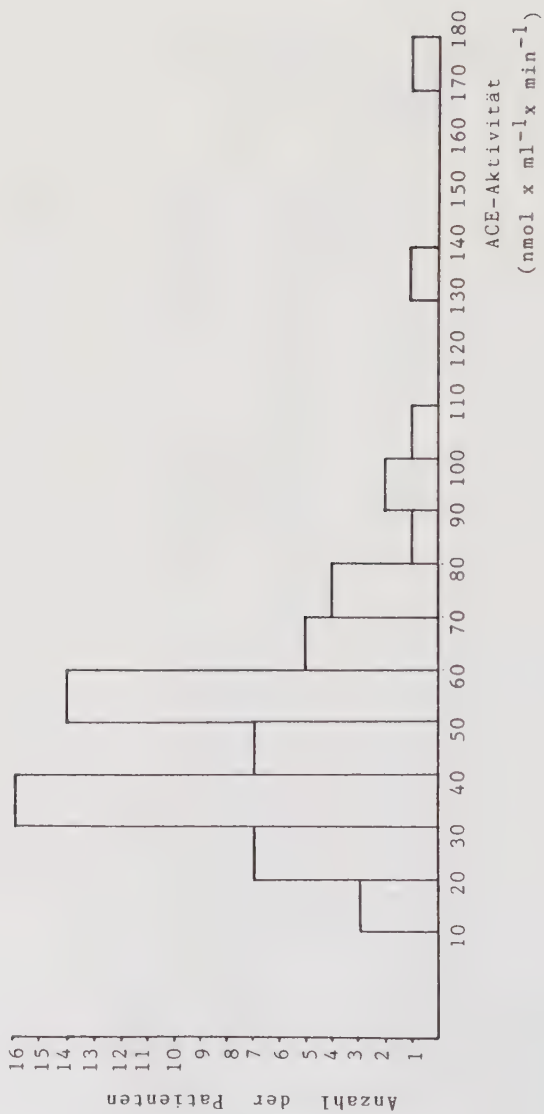


Abb. 32 ACE-Aktivität im Serum von Männern

4. DISKUSSION

4.1. Kininase II und ACE

Zu den frühen wichtigen Ergebnissen der Kininforschung gehörte auch der Befund, daß diese vasoaktiven Peptide in vivo sehr rasch abgebaut werden. Diese schnelle Inaktivierung beruht auf der Aktivität sogenannter unspezifischer Kininasen und des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE). Lange hielt sich die Ansicht, daß es sich bei der (den) Kininase(n) und beim ACE um zwei verschiedene Enzyme handelt.

Dies nachzuweisen war deshalb so schwierig, weil die heute gut bekannten natürlichen Substrate der unspezifischen Kininasen und des Angiotensin-Converting-Enzyme, die Kinine und auch Angiotensin I, lange Zeit nicht charakterisiert werden konnten. Die natürlichen Substrate standen deshalb für Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Aber auch, nachdem Angiotensin I als Substrat identifiziert worden war, hörten die Schwierigkeiten bei der Bestimmung der ACE-Aktivität nicht auf, denn die bei der Spaltung von Angiotensin I entstehenden Produkte Angiotensin II und L-Histidyl-L-Leucin sind analytisch nur sehr schwer zu erfassen. Dies gelingt erst heute mit Hilfe neuer Technologien wie der HPLC (= High pressure liquid chromatography), gaschromatographischer Methoden und der Massenspektrometrie.

Es war deshalb ein großer Fortschritt, als von Cushman und Cheung (12) synthetische Substrate für die Bestimmung der ACE-Aktivität eingeführt wurden. Diese Substanzen, die alle nach einem Schema synthetisiert wurden, boten zum ersten Mal die Möglichkeit durch gezielte Variation der Peptidreste ihre Affinität zum Bindungszentrum zu untersuchen und

somit die katalytische Aktivität der Kininasen zu charakterisieren.

Von der Vielzahl der synthetisierten Kininase-Substrate hat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin die meisten Vorteile für die praktische Enzymologie, da der durch die Kininase-Aktivität abgespaltene Hippursäurerest nach Protonierung mit Lösungsmitteln aus dem Reaktionsgemisch leicht extrahierbar ist. Die Hippursäure kann durch ihr Absorptionsmaximum im kurzwelligen UV-Bereich ($\lambda = 228 \text{ nm}$) leicht identifiziert werden. Dies ist ein ganz besonderer Vorteil, weil in diesem Teil des UV-Spektrums nur wenige Substanzen, die aus biologischen Materialien unter den gleichen Bedingungen extrahierbar sind, einen störenden Einfluß ausüben. Der grundlegende Beweis, daß es sich beim Angiotensin-Converting-Enzyme und der Kininase II um das gleiche Enzym handelt, wurde durch systematische Untersuchungen mit mehr oder weniger spezifischen Inhibitoren nach der Reindarstellung der Enzyme durch geeignete biochemische Trennmethoden erbracht.

Bei unseren Untersuchungen wurde das ACE, das im Seminalplasma in viel höherer Konzentration vorkommt als im Serum mit dem Ziel charakterisiert, seine physiologische und pathophysiologische Bedeutung vor allem bei den Fertilitätsstörungen des Mannes besser zu verstehen.

Zur vollständigen Charakterisierung des ACE wäre sicherlich auch eine Analyse des beachtlichen Kohlenhydrat-Anteils (etwa 30 %) von großem Interesse. Zumal über die funktionelle Bedeutung der Kohlenhydrate des ACE noch wenig bekannt ist. Die Analyse der Kohlenhydrate könnte vielleicht auch Aufschlüsse über Speziesunterschiede bringen, worüber heute ebenfalls noch viel zu geringe Kenntnisse existieren.

4.2. Durchgeführte Nachweismethoden

Am Beginn unserer Untersuchungen stand die Etablierung einer einfachen und zuverlässigen Enzymbestimmungsmethode Nachweismethode. Dabei erwies sich der zuerst verwendete Radioassay nach Ryan et al. (60), der auf der Messung der vom synthetischen Substrat $\langle^3\text{H}\rangle$ -Hip-L-Gly-L-Gly abgespaltenen tritierten Hippursäure beruht, als wenig brauchbar. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Stabilität des tritierten Substrats unter den verwendeten Testbedingungen zurückzuführen.

Als äußerst zuverlässige ACE-Bestimmungsmethode erwies sich der von Cushman und Cheung (12) angegebene Test, der auf der spektroskopischen Messung der durch die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme vom Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin abgespaltenen Hippursäure beruht. Dabei wird zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit die freigesetzte Hippursäure nach Protonierung durch ein mit Wasser nicht mischbares Lösungsmittel aus dem Reaktionsgemisch extrahiert.

Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß vor allem im Serum unspezifische, proteolytische Aktivitäten vorhanden sind, die zu einer Beeinträchtigung der Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode führten.

Diese von uns als unspezifische proteolytische Aktivitäten bezeichneten störenden Enzym-Aktivitäten waren in den verschiedenen Körperflüssigkeiten in unterschiedlicher Stärke nachweisbar. Sie waren jedoch in keinem Fall mit der Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme korreliert. In Relation zur ACE-Aktivität war ihre Aktivität im humanen Seminalplasma am geringsten und im Blutserum am höchsten. Von einer ganzen Reihe gut charakterisierter Proteinase-

Inhibitoren konnten ihre die ACE-Bestimmung störenden Aktivitäten nicht ausgeschaltet werden. Durch die Zugabe geringer Mengen n-Butanol gelang es dann jedoch diese unerwünschten proteolytischen Aktivitäten im Seminalplasma zuverlässig zu unterdrücken. Im Blutserum konnten diese Aktivitäten nicht durch die Zugabe von n-Butanol eliminiert werden. Deshalb wurde zur Bestimmung ihres Anteils an der Hydrolyse des Substrates der spezifische ACE-Inhibitor Captopril (49) in der als ausreichend erkannten Konzentration von 28 μM zugegeben. Diese durch Captopril hemmbare ACE-Aktivität, also die spezifische ACE-Aktivität, betrug bei Männern $73,96 \pm 4,98 \%$ und bei Frauen $63,6 \pm 5,92 \%$ der Gesamtaktivität. Die Unterschiede in der ACE-Hemmbarkeit bei Seren von Männern und Frauen zeigen, daß die gesamten proteolytischen Aktivitäten im Serum bei den beiden Geschlechtern verteilt sind. Allerdings stammen alle untersuchten Seren von Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München, so daß diese Seren nicht als Normalkollektiv angesehen werden können.

Die Bestimmungsmethode wurde nach den Kriterien, die in der klinischen Chemie üblich sind, auf ihre Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft. Zu Vergleichszwecken wurde in Blutseren von männlichen und weiblichen Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München auch die ACE-Aktivität bestimmt und eine gute Übereinstimmung mit entsprechenden Angaben in der Literatur gefunden (49). Allerdings gibt es auch völlig abweichende Ergebnisse über die ACE-Aktivitäten in Körperflüssigkeiten des Menschen in der Literatur. Ein Autor (42) gibt ACE-Aktivitäten an, die sich von den Werten anderer Untersucher und auch von unseren eigenen Ergebnissen im Schnitt um den Faktor 5 abweichen. Eine Erklärung für diese Abweichungen haben wir nicht.

4.3. Eigenschaften des im humanen Seminalplasma vorhandenen Angiotensin-Converting-Enzyme

Die ersten Versuche zur Bestimmung der ACE-Aktivität im humanen Seminalplasma dienten zur Charakterisierung der Bestimmungsmethode. Erst daran anschließend wurde das ACE aus Seminalplasma charakterisiert.

Das Temperatur-Maximum der ACE-Aktivität liegt wahrscheinlich bei 37°C, wie Angaben aus der Literatur belegen (32). Die Aktivität bei 37°C ist bei unseren Versuchen um den Faktor $1,54 \pm 0,066$ höher als bei 22°C. In der Literatur (32) sind jedoch die angegebenen Aktivitäts-differenzen zwischen 22°C und 37°C eher geringer.

Da in der Andrologie die Ansicht vorherrscht, daß die optimale Temperatur für die meisten physiologischen Parameter, bedingt durch die Lage der für die Synthese der Spermatozoen zuständigen männlichen Geschlechtsorgane vielmehr unter 37°C liegt (die Temperatur im Skrotum liegt bei 32°C), sollten auch die Aktivitätsmaxima wichtiger funktioneller Proteine wie z.B. des ACE eher unter 37°C liegen. Eine interessante Bestätigung erfährt diese Hypothese durch neueste experimentelle Befunde aus dem andrologischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik München, wonach auch die Spermatozoen-Motilität in vitro schon bei 32°C ein Maximum zeigt.

Als nächstes wurde die Abhängigkeit der ACE-Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen untersucht. Die Michaeliskonstante $\langle K_m \rangle$ betrug 2,5 mM und war damit bei uns etwas niedriger als der in der Literatur (12, 26) angegebene K_m -Wert von 2,6 mM. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit hatte in unseren Untersuchungen den Wert 3,7 $\mu\text{M}/\text{min}$. Die von Cushman und Cheung (12) angegebene Substratkonzentration von 5,0 mM war auch bei unserer

Adaptierung des Assay optimal, da mit ihr die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht werden konnte, sich aber noch keine Substrathemmung zeigte.

Die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma konnte sowohl mit Gossypol acetic acid als auch mit EDTA und Captopril, einem therapeutisch verwendeten spezifischen Inhibitor des ACE (Lopirin^R), gehemmt werden (39). Die Tatsache, daß Gossypol die ACE-Aktivität hemmt, war vorher nicht bekannt.

Die Hemmung der ACE-Aktivität durch Gossypol, eingesetzt als racemisches Gossypol-Essigsäure Kristallisationsprodukt, ist von großem Interesse, da Gossypol (ein Produkt verschiedener Pflanzen wie Gossypium sp. usw.) in der Lage ist, bei verschiedenen Spezies, darunter auch beim Menschen, die Spermiogenese zu hemmen. Diese Spermiogenese-Hemmung ist, wie einige Experimentatoren (40) zeigen, in den allermeisten Fällen reversibel. Gossypol acetic acid ist das einzige Pharmakon, das bisher in klinischen, kontrollierten Studien, vor allem in der Volksrepublik China zur Hemmung der männlichen Fertilität eingesetzt wurde. Die von uns bestimmte Inhibitorkonstante $\langle K_i \rangle$ hatte einen Wert $7,0 \times 10^{-5}$ M. Ein solcher K_i -Wert deutet schon auf eine gewisse Selektivität der Hemmung hin, obwohl keine reinen ACE-Präparationen verwendet wurden.

Das Pharmakon Captopril (Lopirin^R) erwies sich auch als ein äußerst sensibler Inhibitor der im humanen Seminalplasma vorhandenen ACE-Aktivität. Captopril wird vor allem bei der Therapie des renal bedingten malignen Hochdrucks in Kombination mit anderen Pharmaka verwendet. Die mit Captopril bestimmte Inhibitorkonstante ergab einen Wert von $5,0 \times 10^{-9}$ M. Dieser Wert liegt im selben Bereich wie die Inhibitorkonstante bei Serum-ACE. Sie zeigt auch, daß diese Verbindung hochspezifisch, wahrscheinlich ausschließlich

mit ACE reagiert, obwohl durch die freie SH-Gruppe der Verbindung auch im physiologischen pH-Bereich eine gewisse Reaktivität gegeben ist.

Die Hemmung der ACE-Aktivität des humanen Seminalplasmas mit EDTA (6, 42) ist ein Beweis dafür, daß das ACE aus humanen Seminalplasma eine Metalloprotease ist, denn EDTA bildet mit Kationen aus der Reihe der Übergangsmetalle Chelatkomplexe. Alles deutet darauf hin, daß das ACE aus Seminalplasma, wie das Serum-ACE eine Zink-Metalloprotease ist. Denn bisher wurde bei ACE in vivo noch niemals ein anderes Schwermetallion außer Zink nachgewiesen. Bei in vitro Experimenten konnte Zink durch andere Schwermetalle (Kobalt und Mangan) ersetzt werden, ohne daß Aktivitätsverluste festgestellt werden konnten (81).

4.4. Das Angiotensin-Converting-Enzyme bei verschiedenen andrologischen Krankheitsbildern

Die gemessene Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme im Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie betrug im Mittel $1,98 \pm 0,521 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ($n = 40$). Dieser Wert war damit im Seminalplasma im Mittel um das 38-fache höher als im Blutserum von Männern und sogar um das 52-fache höher als im Blutserum von Frauen, wobei die durch Captopril hemmbare ACE-Aktivität bei den Männern $73,96 \pm 4,98 \%$ und bei den Frauen $63,6 \pm 5,92 \%$ der Gesamtaktivität betrug. Die von uns im Seminalplasma gemessene ACE-Aktivität war etwa um den Faktor 6,4 höher als von anderen Autoren (33) ($308,65 \pm 54,87 \text{ nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, $n = 8$) angegeben wurde.

Eine Erklärung für die im Vergleich zum Blutserum äußerst

hohen ACE-Aktivitäten des menschlichen Seminalplasma gibt es nicht. Man kann lediglich darauf hinweisen, daß auch andere funktionelle Proteine im Seminalplasma in signifikant höheren Konzentrationen vorkommen als in anderen Körperflüssigkeiten. Das führt dazu, daß der osmotische Druck im Seminalplasma zu einem überwiegenden Teil durch die Proteine bedingt ist, während im Blutplasma auch Salze zum osmotischen Druck wesentlich beitragen.

Der Mittelwert der ACE-Aktivität bei Männern mit chronischen Entzündungen der Prostata und der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen war mit $1,69 \pm 0,099 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ signifikant niedriger als bei gesunden Männern mit Normozoospermie (39, 70) als Vergleichskollektiv. Dies war das einzige Mal, wo bei einem Patienten-Kollektiv statistisch signifikante Abweichungen von den normalen ACE-Aktivitäten im Seminalplasma gefunden werden konnten.

Eine Differenzierung der chronischen Adnexitiden nach dem Erreger (viral, bakteriell, Protozoen) war damit jedoch nicht zu erreichen. Eine Unterscheidung zwischen bakteriellen und viralen Infekten erscheint nach dem heutigen Kenntnisstand nur durch Bestimmung von Metaboliten des Nukleotidstoffwechsels des zellulären Immunsystems (T-Zellsystem), wie z.B. von Neopterin, einem Produkt des Guaninstoffwechsels, möglich.

Bemerkenswert ist, daß chronische Entzündungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der ACE-Aktivität im humanen Seminalplasma führen. Dies liefert einen ersten Hinweis, daß die Prostata, die zum Gesamtvolumen des Ejakulates 30 % beiträgt, einer der Synthesorte des ACE des Seminalplasma ist. Denn es ist allgemein bekannt, daß bei entzündlichen Erkrankungen dieses Organs die Sekretionsleistung abnimmt.

Diese Annahme, daß die Prostata ACE synthetisiert, wurde durch die Bestimmung der ACE-Aktivitäten in Split-Ejakulaten erhärtet, da in der Fraktion I, die zum großen Teil das Sekret der Prostata enthält, signifikant höhere ACE-Aktivitäten gefunden wurden (38, 39) als in der Fraktion II. Nach chromatographischer Auftrennung von Seminalplasma (Stationäre Phase: Sephadex G 200) erscheint der 1. Peak im Ausschlußvolumen. Die im 1. Peak eluierten Makromoleküle wurden im Elektronenmikroskop als Membranvesikel identifiziert. Dieser erste Peak enthielt auch einen großen Teil der ACE-Aktivität. Solche Membranvesikel wurden in der Literatur bereits beschrieben und in der irrigen Annahme, daß es sich um ausschließliche Sekretionsprodukte der Prostata handelt, als Prostatasomen bezeichnet (82).

Nach unseren Ergebnissen stammt die ACE-Aktivität im humanen Seminalplasma nur zum Teil aus der Prostata und ist im nativen Zustand fast ausschließlich an diese Membranvesikel gebunden (39), deren funktionelle Bedeutung weitgehend unbekannt ist. Bemerkenswert ist auch, daß von Cushman und Cheung (13) nur geringe ACE-Aktivitäten im Prostatagewebe von Ratten nachgewiesen wurden.

Die Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma vor und nach Vasektomie an den selben Patienten zeigte, wie andere Autoren (33) ebenfalls fanden, daß nach Vasektomie die ACE-Aktivität signifikant vermindert war. Dies ist ein Hinweis dafür, daß die Synthese von ACE neben der Prostata auch im Hoden und Nebenhoden stattfindet, jedoch wahrscheinlich nicht in der Bläschendrüse. Es kann außerdem angenommen werden, daß das von Hoden- und Nebenhodengewebe sezernierte ACE im nativen Zustand ebenfalls zum überwiegenden Teil an vesikuläre Strukturen gebunden ist. Da der größte Teil der ACE-Aktivität vom nativen Seminalplasma in der präparativen Ultrazentrifuge sedimentiert werden kann, und da außerdem die Ergebnisse der ACE-Bestimmung in Seminalplasmen nach

Vasektomie eine bedeutende Aktivitätsverminderung zeigt, kann gefolgert werden, daß auch die aus Hoden und Nebenhoden stammenden ACE-Aktivitäten an makromolekulare Strukturen gebunden sind. Cushman und Cheung (13) fanden bei der Ratte bemerkenswerterweise in Hoden- und Nebenhodengewebe die höchsten ACE-Aktivitäten.

Die von einer schwedischen Arbeitsgruppe (Stegmayr et al.)(82) zum ersten Mal beschriebenen Vesikel, die von ihnen als Prostatasomen bezeichnet wurden, enthielten beinahe die gesamte ATPase-Aktivität des Seminalplasma. Eine weitere Charakterisierung der ATPasen durch diese Arbeitsgruppe erfolgte nicht. Diese Vesikel enthalten auch signifikant mehr Zink und Calcium als das übrige Seminalplasma. In unserer Arbeitsgruppe in der Andrologie konnte gezeigt werden (47), daß das Calcium der Membranvesikel wahrscheinlich zum überwiegenden Teil an calciumbindende Proteine (Calmodulin) gebunden ist.

Die ACE-Aktivität wurde auch im Seminalplasma von Patienten mit Morbus Klinefelter untersucht. Diese Erkrankung, bei der die phänotypisch männlichen Patienten einen XXY-Chromosomensatz aufweisen, ist mit Infertilität verbunden.

Da das Klinefelter Syndrom oft mit einem relativen oder auch absoluten Androgenmangel auftritt, lag es nahe nachzuprüfen, ob die ACE-Aktivität in irgendeiner Weise von den vorhandenen Androgenspiegeln abhängt. Dafür gibt es in der Literatur (69) einige Hinweise. Die gemessenen ACE-Spiegel ($\bar{x} = 2,21 \pm 0,234 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) unterscheiden sich nicht signifikant von normozoospermen Vergleichskollektiven ($\bar{x} = 1,98 \pm 0,521 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ohne bekannte Chromosomen-Anomalien (69).

Die Ergebnisse bei den Klinefelter Patienten schließen eine Abhängigkeit der ACE-Aktivitäten von den Androgenspiegeln

nicht aus. Denn in keinem Fall ist eine absolute Androgen-Defizienz anzunehmen, weil ja ein Teil der Androgene auch bei Klinefelter Patienten in der Nebennierenrinde gebildet wird. Möglicherweise stellt sich bei Morbus Klinefelter der normale ACE-Spiegel lediglich langsamer ein als bei Gesunden. Unterschiede wären nach dieser Hypothese nur nachweisbar, wenn mit den ACE-Messungen schon während der Pubertät, die bei Klinefelter Patienten wahrscheinlich verzögert abläuft, begonnen würde.

4.5. Ausblicke

Über die funktionelle Bedeutung des Angiotensin-Converting-Enzyme im Seminalplasma ist so gut wie nichts bekannt, obwohl es in signifikant höheren Aktivitäten vorhanden ist als in jeder anderen Körperflüssigkeit und jedem anderen Gewebe.

Eine regulatorische Bedeutung für die Motilität ist, wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, auszuschließen, obwohl die Kinine, welche die Motilität von Spermatozoen verbessern (62), durch das ACE abgebaut werden. Noch nicht geklärt wurde, ob das ACE im Seminalplasma tatsächlich in aktiver Form vorliegt, oder ob es wirksame Inhibitoren gibt, die in vivo die ACE-Aktivität zu hemmen in der Lage sind. Es gibt verschiedene Hinweise, wonach bestimmte Peptidhormone wie z.B. Insulin und vielleicht das mit Insulin strukturidentische Relaxin, das im Seminalplasma ebenfalls in signifikant höheren Konzentrationen vorkommt, wie in anderen Körperflüssigkeiten, solche Inhibitoren sein könnten. Eindeutige Ergebnisse stehen allerdings noch aus.

Es war das Ziel dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung

des ACE im Seminalplasma einer Klärung näher zu bringen (38). Es wurde gezeigt, daß ACE aus dem Seminalplasma in seinen Eigenschaften zumindest zum Teil mit ACE von anderen Geweben und Körperflüssigkeiten übereinstimmt, was durch die Bestimmung der Aktivitätsparameter (K_m , V_{max} , K_i) gezeigt werden konnte. Zum ersten Mal gelang es uns zu belegen, daß das wegen seiner Spermiogenese-hemmenden Eigenschaften äußerst bedeutsame Pharmakon Gossypol in der Lage ist auch die ACE-Aktivität zu hemmen. Dieses Ergebnis ist insofern bedeutungsvoll, da das ACE nun das zweite Enzym des männlichen Genitaltraktes ist, das von Gossypol, neben der spermienspezifischen LDH-X (83), gehemmt werden kann. Diese unsere Ergebnisse werden dazu beitragen, die Wirkungsweise von Gossypol auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Eigenschaften des Angiotensin-Converting-Enzyme wurden untersucht (37).

Zur Bestimmung der Aktivität des ACE wurde die von Cushman und Cheung (12) angegebene Methode verwendet. Durch Zugabe von höheren Alkoholen (n-Butanol) konnte die Aktivität unspezifischer Kininasen im Seminalplasma weitgehend und im Serum kaum unterdrückt werden. Das Testverfahren wurde in Bezug auf seine Reproduzierbarkeit und Linearität überprüft.

Das ACE im humanen Seminalplasma wurde charakterisiert. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit ($V_{max} = 3,7 \mu\text{M}/\text{min}$) bei optimaler Substratkonzentration (5 mM), die Michaeliskonstante ($K_m = 2,5 \text{ mM}$) und die Inhibitorkonstanten (K_i) der ACE-Inhibitoren Captopril ($K_i = 5,0 \times 10^{-9} \text{ M}$), Gossypol, eingesetzt als Gossypol acetic acid ($K_i = 7,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) und EDTA ($K_i = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) wurden ermittelt.

Es ergab sich für die ACE-Aktivität im Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie ein Mittelwert von $1,98 \pm 0,521 \mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Das ist im Vergleich zu den Werten im Serum von Frauen um das 52-fache und zu den Werten im Serum von Männern um das 38-fache höher. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Prostata und der übrigen akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurde im Seminalplasma eine signifikante Abnahme der ACE-Aktivität gefunden.

Das Angiotensin-Converting-Enzyme im humanen Seminalplasma ist hauptsächlich an makromolekulare Strukturen gebunden, die als Membranvesikel identifiziert werden konnten. Sie stammen größtenteils aus der Prostata. Dies konnte durch gelchromatographische Auftrennung von Seminalplasma gezeigt

werden. Ebenso spricht der Nachweis einer signifikant erhöhten ACE-Aktivität in der 1. Fraktion von Split-Ejakulaten und die Bestimmung der ACE-Aktivität in Seminalplasmen, erhalten vor und nach Vasektomie, für die Herkunft eines Teils der ACE-Aktivität aus der Prostata.

Die Verteilung der ACE-Aktivitäten in Split-Ejakulaten und im Seminalplasma, das vor und nach Vasektomie erhalten wurde, belegt, zusammen mit der Sedimentierbarkeit der ACE-Aktivität in der präparativen Ultrazentrifuge die Membranbindung des ACE aus dem menschlichen Seminalplasma.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alberts, C., Van der Schoot, J.G. and van Daatselaar, J.J. (1983)
5 UB 6 sub 7 Ga scintigraphy, serum lysozyme and angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis
Eur. J. Respir. Dis. 64: 38-46
- 2) Alken, C.-E., Sokeland, J. (1983)
Urologie
Thieme, Verlag, 9. Auflage, S. 190
- 3) Alken, C.-E., Sokeland, J. (1983)
Urologie
Thieme, Verlag, 9. Auflage, S. 198-199
- 4) Alken, C.-E., Sokeland, J. (1983)
Urologie
Thieme, Verlag, 9. Auflage, S. 344-355
- 5) Bakhle, Y.S. (1968)
Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung
Nature 220: 919-921
- 6) Barman, T.E. (1974)
Angiotensin-Converting-Enzyme
In: Enzyme Handbook Supplement I, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, S. 343-344
- 7) Bing, J., Poulsen, K. and Markussen, J. (1974)
The ability of various insulins and insulin fragments to inhibit the angiotensin I converting enzyme
Acta. Path. Microbiol. Scand. (Sect. A) 82 (6): 777-782

- 8) Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H. (1984)
Dermatologie und Venerologie
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 3. Auflage,
S. 816-822
- 9) Caldwell, P.R., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Das, M. and
Soffer, R.L. (1976)
Angiotensin-converting-enzyme: vascular endothelial
localization
Science 191 (4231): 1050-1051
- 10) Chiu, A.T. and Peach, M.I. (1974)
Inhibition of induced aldosterone biosynthesis with a
specific antagonist of angiotensin II
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 341-344
- 11) Craven, D.J., Warren, A.Y. and Symonds, E.M. (1981)
Active and inactive renin in human seminalplasma
Archives of Androl. 7: 63-67
- 12) Cushman, D.W. and Cheung, H.S. (1971)
Spectrophotometric Assay and Properties of the Angioten-
sin-Converting-Enzyme of Rabbit Lung
Biochem. Pharmacol. 20: 1637-1648
- 13) Cushman, D.W. and Cheung, H.S. (1971)
Concentrations of angiotensin-converting enzyme in
tissues of the rat
Biochim. Biophys. Acta 250: 261-265
- 14) Dennhardt, R. and Haberich, F.J. (1972)
Effects of kallikrein on the absorption of water, elec-
trolytes and hexoses in the intestine of rats
In: Haberland, G.L. and Rohen, J.W. (eds.), Kininogena-
ses-Kallikrein 1, Schattauer, Stuttgart-New York, 81-89

- 15) Elisseeva, Y.E., Orechovich, V.N., Pavlikhina, L.V. and Alexeenko, L.P. (1971)
Carboxy-cathepsin - a key of regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure
Clin. Chim. A. 31: 413-416
- 16) Erdös, E.G. (1970)
Bradykinin, Kallidin and Kallikrein
In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H., Welch (eds.)
A.D. Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XXV
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 427-481
- 17) Erdös, E.G. (1976)
Conversion of angiotensin I to angiotensin II
Amer. J. Med. 60: 749-759
- 18) Ferreira, S.H. and Vane, J.R. (1965)
The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat
Br. J. Pharmacol. Chemoth. 30: 417-424
- 19) Fink, E. and Schill, W.-B. (1983)
Studies on Tissue Kallikrein in Human Seminalplasma
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Fritz, H. and Huber, P. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 147-154
- 20) Fink, E., Schill, W.-B. and Fiedler, F. (1985)
Tissue Kallikrein in Human Seminalplasma
Protides of the biological fluids 32: 299-303
- 21) Frey, E.K., Kraut, H. (1928)
Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung
Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 133: 1-56

- 22) Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E., Vogel, R., Zickgraf, G. und Trautschold, I. (1968)
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren
Enke Verlag, Stuttgart
- 23) Friedland, J., Silverstein, E. (1976)
A Sensitive Fluorometric Assay for Serum Angiotensin-Converting-Enzyme
Am. J. of Clin. Path. 66: 416-424
- 24) Fritz, H., Fiedler, F., Dietl, T., Warwas, E. et al. (1977)
On the relationship between porcine pancreatic, submandibular and urinary kallikrein
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, T. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 15-28
- 25) Hafez, E.S.E. (1977)
Techniques of human andrology
North-Holland Publ. Co., Amsterdam, S.148-149
- 26) Hara, A., Fukuyama, A. and Epstein, W.L. (1981)
Angiotensin-Converting-Enzyme Measured in Mouse Tissue by Inhibition of Histidyl-Leucine Peptidase
Biochem. Med. 26: 199-210
- 27) Heite, H.J., Wokalek, H. (1980)
Männerheilkunde
Fischer Verlag, Stuttgart, S. 23-25
- 28) Helmer, O.M. (1957)
Differentiation between two forms of angiotonin by means of spirally cut strips of rabbit aorta
Am. J. Physiol. 188: 571-577

- 29) Hohenfellner, R., Zingg, E.J. (1982)
Urologie Band I
Thieme Verlag, S. 389-392
- 30) Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H., Knonsalla, M. and
Dahlheim, H. (1980)
Experimental Approach to the Physiological Role of
Gonadal Angiotensin I Converting Enzyme
Pflüger's Archiv 384: R 28
- 31) Hohlbrugger, G. and Dahlheim, H. (1981)
Converting Enzyme - A possible regulatory Component of
Male Fertility
III. World Congress of Human Reproduction, March 22.-
26. 1981 - ICC Berlin, 321-333 (Abstr.)
- 32) Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H. and Dahlheim, H.
(1982)
Angiotensin I converting enzyme in rat testis, epidymi-
dis and vas deferens under different conditions
J. Reprod. Fert. 65: 97-103
- 33) Hohlbrugger, G., Pschorr, J. and Dahlheim, H. (1984)
Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of
fertile and infertile men
Fertility and Sterility 41: (2): 324-325
- 34) Inagami, T., Takahashi, N., Yokosawa, N. and Tokii, Y.
(1979)
Partial purification of prorenin and activation by
kallikrein: A possible new link between renin and
kallikrein system
Advances in Experimental Medicine and Biology 120 B:
415-428

- 35) Kienitz, T. und Schill, W.-B. (1977)
Orale Kallikrein-Therapie der Asthenozoospermie
Fortschr. der Med. 95: 2102-2105
- 36) Krassnigg, F., Toepfer-Petersen, E., Sachse, K., Hackl, I., Frick, J. und Schill, W.-B. (1983)
Untersuchungen über den Einfluß prostatistischer Faktoren auf die Spermatozoen-Motilität
Fortschritte der Fertilitätsforschung FDF 12: 164-169
- 37) Krassnigg, F., Engl, R., Toepfer-Petersen, E. and Schill, W.-B. (1984)
Studies on angiotensin converting enzyme in human seminal plasma
Winter School on Proteinases, Bohinj/Yugoslavia (Abstr.)
- 38) Krassnigg, F., Niederhauser, H., Placzek, R., Frick, J. and Schill, W.-B. (1984)
Investigations on the functional role of angiotensin converting enzyme (ACE) in human seminal plasma
Kinin 84 (in Press)
- 39) Krassnigg, F., Engl, R., Toepfer-Petersen, E., Fries, R. and Schill, W.-B. (1985)
Characterization of angiotensin converting enzyme in human seminal plasma
Protides of the biological fluids 32 : 285-288
- 40) Krassnigg, F., Placzek, R., Engl, R., Frick, J. and Schill, W.-B. (1985)
Influence of psychotropic drugs, gossypol and acetylcholin receptor blockers on the motility of human spermatozoa in vitro
In: Runnebaum, B., Rabe, T. and Kiesel, L. (eds.), Future Aspects of Contraception, MTP, Boston-The Hague-Dordrecht-Lancaster, pp. 251-255

- 41) Kraus, R., Engl, R., Frick, J., Krassnigg, F. and Schill, W.-B. (1984)
Functional role and origin of angiotensin converting enzyme (ACE) in human seminal plasma
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 365: p. 928
- 42) Liebermann, J. (1975)
Elevation of Serum Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) Level in Sarcoidosis
Am. J. of Med. 59: 365-372
- 43) Lineweaver, H. and Burk, D. (1934)
The determination of enzyme dissociation constants
J. Am. Chem. Soc. 56: 658-666
- 44) Meng, K. and Haberland, G.L. (1973)
Influence of kallikrein on glucose transport in the isolated intestine
In: Haberland, G.L. and Rohen, J.W. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 75-81
- 45) Moriwaki, C., Moriya, Y., Yamaguchi, K., Kizuki, K. and Fujimori, H. (1973)
Intestinal absorption of pancreatic kallikrein and some aspects of its physiological role
In: Haberland, G.L. and Rohen, J.W. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 57-66
- 46) Munoz, J.M., Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C. and Leloir, L.F. (1940)
Mechanism of renal hypertension
Am. J. M. Sc. 200: 608-618

- 47) Niederhauser, H., Maier, I., Tourlakidou, S., Krassnigg, F. and Schill, W.-B. (1984)
Distribution of functional proteins in human seminal plasma
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 365: p. 936
- 48) Ohara, I. (1977)
The effect of kallikrein in body fluid circulation
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, T. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein 4, Schattauer Verlag,
Stuttgart-New York, pp. 321-331
- 49) Ondetti, M.A. and Cushman, D.W. (1982)
Enzymes of the renin-angiotensin-system and their inhibitors
Ann. Rev. Biochem. 51: 283-308
- 50) Oparil, S., Low, J. and Koerner, T.J. (1976)
Altered angiotensin I conversion in pulmonary disease
Clinical Science and Molecular Medicine 51: 537-543
- 51) Piquilloud Y., Reinhartz, A. and Roth, M. (1970)
Studies on Angiotensin-converting-enzyme with different substrates
Biochem. Biophys. Acta 206: 136-142
- 52) Placzek, R., Engl, R., Krassnigg, F. and Schill, W.-B. (1984)
Factors influencing the motility of human spermatozoa in vitro
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 365: p. 939
- 53) Preissler, G. und Schill, W.-B. (1978)
Der Einfluß von Kallikrein auf die Zervixmukuspenetration
Fortschritte der Andrologie 6: 88-100

- 54) Rabes, H. (1975)
Influence of kallikrein on proliferation of liver cells
in vivo and in vitro
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Blümel, G. and Huber,
P. (eds.), Kininogenases-Kallikrein 3, Schattauer
Verlag, Stuttgart-New York, pp. 137-146
- 55) Rixon, R.H. and Whitefield, J.F. (1972)
Kallikrein, Kinin and Cell Proliferation
In: Haberland, G.L. and Rohen, J.W. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-
New York, pp. 131-145
- 56) Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. and Rosenfeld, G.
(1949)
Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulating
factor released from plasma globulin by snake venoms and
by trypsin
Am.J. Physiol. 156: 261-273
- 57) Rohen, J.W. (1978)
Der Einfluß des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Sperma-
togenese
Fortschritte der Andrologie 6: 16-25
- 58) Rohen, J.W. and Stuttmann, R. (1977)
The early postnatal development of the germinative
epithelium of the testis in the albino rat under the
influence of kallikrein
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, R. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-
New York, pp. 217-223
- 59) Ryan, J.W., Roblero, J. and Stewart, J.M. (1970)
Inactivation of Bradykinin in Rat Lung
Adv. Exp. Med. Biol. 8: 263-271

- 60) Ryan, J.W., Chung, A., Ammons, C. and Carlton, M.L.
(1977)
A Simple Radioassay for Angiotensin-Converting-Enzyme
Biochem. J. 167: 501-504
- 61) Schill, W.-B. and Haberland, G.L. (1974)
Kinin-induced inhancement of sperm motility
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 335: 229-231
- 62) Schill, W.-B. and Haberland, G.L. (1974)
The possible role of kinins in sperm motility
Int. J. Fert. 19: 163-167
- 63) Schill, W.-B. und Haberland, G.L. (1975)
Wirkungen verschiedener Komponenten des Kallikrein-
Kinin-Systems auf die Spermatozoenmotilität in vitro
Klin. Wschr. 53: 73-79
- 64) Schill, W.-B. (1977)
Kallikrein as a therapeutical means in the treatment of
male infertility
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, T. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein 4, Schattauer Verlag, Stuttgart
New York, pp. 215-280
- 65) Schill, W.-B. (1978)
Klinische Erfahrungen mit Kallikrein bei der Therapie
der Oligo- und Asthenozoospermie
Fortschritte der Andrologie 6: 52-72
- 66) Schill, W.-B., Rjosk, H.-K. und Krizic, A. (1980)
Andrologische, biochemische und endokrinologische Unter-
suchungen bei subfertilen Männern während Kallikrein-
therapie
Der Hautarzt 31: 191-197

- 67) Schill, W.-B. and Littich, M. (1981)
Split ejaculate insemination with and without the
addition of kallikrein
Andrologia 13: 121-126
- 68) Schill, W.-B. (1982)
Medical treatment of idiopathic normogonadotropic oligo-
zoospermia
Int. J. Androl. 5: 135-153
- 69) Schill, W.-B., Strasser, R., Krassnigg, F., Müller-
Esterl, W. and Fink, E. (1984)
Spermatological Investigations in the Men with Kline-
felter's Syndrome
In: Bandmann, H.-J., Breit, R. (eds.)
Klinefelter's Syndrome, Springer Verlag, Berlin-Heidel-
berg, pp. 147-162
- 70) Schill, W.-B., Krassnigg, F., Müller-Esterl, W. and
Fink, E. (1985)
Quantitative Determination of different proteins in
normal and pathological semen
Protides of the biological fluids 32: 293-297
- 71) Schirren, C. (1971)
Praktische Andrologie
Hartmann Verlag, Berlin, S. 70-71
- 72) Schweisfurth, H. (1980)
Das Angiotensin-I-converting-enzyme bei verschiedenen
Erkrankungen
Med. Welt 31 (48): 1758-1759
- 73) Segel, H. (1968)
Biochemical Calculations 1,
Ley, J.W. and Sons INC. NY

74) Senior, J. (1974)

The Kallikrein-Kinin-System and Parturition in the Rat
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and
Huber, P. (eds.)

Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-
New York, pp. 41-45

75) Silverstein, E., Friedland, J., Lyons, H.A. and Gourin,
A. (1976)

Elevation of Angiotensin-Converting-Enzyme in Granuloma-
tous Lymph Nodes and Serum in Sarcoidosis: Clinical and
possible Pathogenic Significance

Ann. N.Y. Sci. 278: 498-513

76) Silverstein, E., Friedland, J., Lyons, H.A. and Gourin,
A. (1976)

Markedly elevated angiotensin converting enzyme in lymph
nodes containing non-necrotizing granulomas in sarcoi-
dosis

Proc. Natl. Acad. Sci. 73 (6): 2137-2141

77) Silverstein, E., Pertschuk, L.P. and Friedland, J.
(1979)

Immunofluorescent localization of angiotensin I conver-
ting enzyme in epitheloid and giant cells of sarcoidosis
granulomas

Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (12): 6646-6648

78) Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R. and Shumway, N.P.
(1954)

The existence of two forms of hypertensin

J. Exp. Med. 99: 275-282

- 79) Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R. and Shumway, N.P.
(1954)
Purification of hypertensin
J. Exp. Med. 100: 363-370
- 80) Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R. and Shumway, N.P.
(1955)
Amino acid composition and electrophoretic properties of
hypertensin I
J. Exp. Med. 102: 435-440
- 81) Soffer, R.L. (1976)
Angiotensin-Converting-Enzyme and the Regulation of
Vasoactive Peptides
Ann. Rev. of Biochem. 45: 73-94
- 82) Stegmayr, B. and Ronquist, G. (1982)
Promotive Effect of Human Sperm Progressive Motility by
Prostasomes
Urological Research 10: 253-257
- 83) Stephens, D.T., Critchlow, L.M. and Hoskins, D.D. (1983)
Mechanism of inhibition by gossypol of glycolysis and
motility of monkey spermatozoa in vitro
J. Reprod. Fert. 69: 447-452
- 84) Stevens, R.L., Micalizzi, E.R., Fessler, D.C. and Pals,
D.T. (1972)
Angiotensin I converting enzyme of calf lung. Method of
assay and partial purification
Biochemistry 11: 2999-3007

- 85) Stüttgen, G. (1973)
Clinical substantiation of the effect of kallikrein
In: Haberland, G.L. and Rohen, J.W. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein 1, Schattauer Verlag, Stuttgart
New York, pp. 189-193
- 86) Tigerstedt, R. und Bergman, P.G. (1898)
Niere und Kreislauf
Skand. Arch. Physiol. 8: 223-271
- 87) Tschesche, H., Mair, G. and Godec, G. (1979)
The Primary Structure of Porcine Glandular Kallikreins
Advances in Experimental Medicine and Biology 120 A:
245-260
- 88) Wallner, O., Schill, W.-B., Grösser, A. and Fritz, H.
(1975)
Participation of the Kallikrein-Kinin-System in Sperm
Penetration Through Cervical Mucus: In Vitro Studies
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and
Huber, P. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein 2, Schattauer Verlag, Stuttgart
New York, pp. 63-70
- 89) Werle, E., Götz, W. und Keppler, A. (1937)
Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm
und über eine neue darmkontrahierende Substanz
Biochem. Ztschr. 289: 217-233
- 90) Werle, E. und Multhaupt, G. (1937)
Über den einfachen Nachweis der peripheren Gefäßwirkung
des Padutins
Münchn. med. Wschr. 84 (1): 407-409

- 91) Werle, E., Trautschold, I. and Leysath, G. (1961)
Isolation and structure of kallidine
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 326: 174-176
- 92) Werle, E. (1973)
History of kallikrein and some aspects of its chemistry
and physiology
In: Haberland, G.L. and Rohen, J.W. (eds.)
Kininogenases-Kallikrein I, Schattauer Verlag, Stuttgart
New York, pp. 7-22
- 93) Yang, H.Y.T., Erdös, E.G. and Levin, Y. (1971)
Characterization of a dipeptide hydrolase (Kininase II:
angiotensin I converting enzyme)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 117: 291-300

7. DANKSAGUNG

Prof. Dr. med. W.-B. Schill bin ich für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die hilfreichen Ratschläge zu großem Dank verpflichtet.

Ganz herzlich danke ich auch Herrn Dr. rer. nat. F. Krassnigg, ohne dessen Kooperation und Hilfsbereitschaft die Arbeit sehr erschwert gewesen wäre.

Bei Problemen technischer Art unterstützten mich freundlicherweise Frau Dr. rer. nat. E. Töpfer-Petersen, Frau Feifel und Frau Weiss.

8. LEBENSLAUF

Am 17. November 1958 wurde ich, Reimund Harald Engl, als erster Sohn des Einschalers Karl Engl und seiner Frau Anneliese Engl, geborene Brettmann, in Windischbergerdorf Kreis Cham geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Osterhofen von 1965-1970 besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Vilshofen. Dort erwarb ich nach bestandenen Abitur am 27.6.1979 die Allgemeine Hochschulreife.

Im Wintersemester 1979/80 begann ich mein Studium der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dort legte ich am 21.1.1985 mit Erfolg die Zahnärztliche Prüfung ab. Am 23.1.1985 erhielt ich die Approbation als Zahnarzt.

